



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA NA VACA LEITEIRA**

**ROMÃO DA CRUZ FRANÇA**

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutor George Thomas Stilwell

Dr. João Guilherme dos Santos Paisana

**ORIENTADOR**

Dr. João Guilherme dos Santos Paisana

**CO-ORIENTADOR**

Doutor José Pedro Cardoso Lemos

**2013**

**LISBOA**





**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA NA VACA LEITEIRA**

**ROMÃO DA CRUZ FRANÇA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutor George Thomas Stilwell

Dr. João Guilherme dos Santos Paisana

**ORIENTADOR**

Dr. João Guilherme dos Santos Paisana

**CO-ORIENTADOR**

Doutor José Pedro Cardoso Lemos

**2013**

**LISBOA**

## **Agradecimentos**

Terminada toda esta caminhada que culmina com a elaboração da presente Dissertação de Mestrado Integrado, gostaria de manifestar os meus sinceros agradecimentos àqueles que, de alguma forma, me ajudaram neste longo percurso, tornando-o possível.

Em primeiro lugar, ao meu orientador, Dr. João Guilherme Paisana, pela paciência, sabedoria e amizade que me dispensou desde o primeiro dia.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor José Pedro Lemos, pela extensa e preciosa ajuda do primeiro ao último momento, e em especial, pela paciência e ajuda nos momentos menos fáceis.

Ao Dr. Miguel Matos, da Pfizer, pela total disponibilidade e pelo precioso auxílio que me deu no tratamento de dados e análises laboratoriais.

Ao Dr. José Maria Cardoso, pelo constante incentivo e pelos sábios conselhos.

A todos os colegas e amigos que me acompanharam inesquecível percurso.

E por último, um agradecimento particular, à minha mãe e irmã, por todo o ânimo que me deram e por nunca, ao longo deste vasto caminho, terem abrandado o apoio um único momento.

A todos, que de alguma forma, me apoiaram e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, o meu sincero Muito Obrigado!

# Hipocalcemia Subclínica na Vaca Leiteira

## Resumo

Como o próprio nome indica, o objectivo central desta dissertação consiste na realização de um estudo sobre uma doença muito comum nas vacas leiteiras no período pós-parto: a hipocalcemia subclínica.

Trata-se de uma patologia metabólica que atinge os bovinos, especialmente os de alta produção leiteira, e que consiste na descida dos valores séricos de cálcio e numa série de outros problemas subsequentes, tais como a parésia e o decúbito, entre outros. A etiologia é variada mas a doença está associada ao parto e ao início da lactação, que provocam um aumento exponencial das necessidades de cálcio (Ca). Apesar de ser uma patologia muito comum nos bovinos, não lhes é exclusiva, já que ocorre, em muito menor grau, nos ovinos e nos caprinos.

A hipocalcemia mais severa, dita clínica ( $\text{Ca} < 5 \text{ mg/dl}$ ), tem grande gravidade do ponto de vista económico, pois se não for rapidamente controlada pode levar à perda do animal afectado; por outro lado, a hipocalcemia subclínica assume um papel mais insidioso levando a perdas de produção e de fertilidade.

No presente ensaio foram seleccionadas para recolha amostras sanguíneas de 12 animais de uma exploração leiteira da zona do Ribatejo, pretendendo-se determinar a ocorrência de hipocalcemia no efectivo, tal como a sua gravidade e os efeitos da patologia, nomeadamente, na produção de leite, no tipo de parto e na performance reprodutiva (número de serviços, dias em aberto, etc.) Dos 12 animais analisados 8 apresentavam valores inferiores a  $8 \text{ mg/dl}$  de cálcio sérico, encontrando-se na altura da recolha da amostra numa situação de hipocalcemia, mais precisamente hipocalcemia subclínica ( $\text{Ca } 5 - 7,9 \text{ mg/dl}$ ). Os resultados obtidos demonstram uma elevada prevalência da patologia, na ordem dos 64% da amostragem, e revelam também que, apesar dessa elevada ocorrência no efectivo os parâmetros em estudo não demonstram diferenças significativas entre as vacas com níveis séricos de cálcio normais ou as que apresentavam défices.

Palavras-chave: Medicina Veterinária; Hipocalcemia Subclínica; Vaca Leiteira;

## **Subclinical Hypocalcemia in Dairy Cow**

### **Abstract**

As the name suggests, the main objective of this dissertation is the achievement of a study of a very common disease in dairy cows in the postpartum period: a subclinical hypocalcemia. It is a metabolic disease that affects cattle, especially animals with high milk production, which is the lowering of serum calcium and a subsequent number of other problems, such as decubitus and paresis, among others. The etiology is varied but the disease is associated with the delivery and early lactation, causing an exponential increase in needs for calcium (Ca). Despite being a very common disease in cattle, they are not unique, since it occurs to a much lesser extent, in sheep and goats.

More severe Hypocalcemia (Ca <5 mg/dl), is a serious problem from a economic point of view, since if it is not readily controlled can lead to loss of the affected animal, on the other hand, subclinical hypocalcemia plays a more insidious role leading to loss of production and fertility.

In this assay were selected for collecting blood samples from 12 animals on a dairy farm in the area of Ribatejo, which seeks to determine the occurrence of hypocalcemia in the herd, as the severity and effects of disease, particularly in milk production, the method of delivery and reproductive performance (number of services, days open, etc.). Of the 12 animals analyzed eight had values below 0.8 mg/dl of serum calcium, lying at the time of sample collection in a state of hypocalcemia more precisely subclinical hypocalcemia (Ca 5 – 7,9 mg/dl). The results show a high prevalence of the condition, the order of 64% of the sample, and also reveal that, despite this high prevalence in the herd parameters under study did not demonstrate significant differences between cows with normal serum calcium levels or who had deficits.

Keywords: Veterinary Medicine; Subclinical hypocalcemia; Dairy Cow;

## Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract.....	iii
Índice .....	iv
Índice de figuras.....	vi
Índice de quadros .....	vi
Lista de abreviaturas.....	vii
Lista de símbolos .....	vii
Nota prévia .....	1
Introdução .....	3
Parte I – Período de Estágio .....	5
1. Introdução .....	5
2. Casuística.....	5
2.1 Casuística dos bovinos.....	6
2.1.1. Profilaxia médica.....	6
2.1.2. Clínica médica.....	7
2.1.2.1. Aparelho reprodutor.....	7
2.1.2.2. Aparelho digestivo .....	8
2.1.2.3. Aparelho músculo-esquelético.....	9
2.1.2.4. Aparelho respiratório .....	9
2.1.2.5. Glândula mamária .....	9
2.1.2.6. Controlo reprodutivo .....	9
2.1.2.7. Doenças metabólicas .....	10
2.1.3 Clínica cirúrgica.....	10
2.2. Casuística dos caprinos.....	11
Parte II – Revisão Bibliográfica .....	13
1. Aspectos gerais de anatomia e fisiologia .....	13
1.1. Anatomia da glândula mamária .....	13
1.2. Lactogénese .....	13
1.3. Ciclo da lactação .....	15
2. Metabolismo do cálcio na febre do leite .....	16
2.1 Factores predisponentes .....	20
2.1.1. Raça.....	20
2.1.2. Idade .....	20
2.1.3. Dieta.....	20
3. Vitamina D.....	21
3.1. Metabolismo da Vitamina D3 .....	21
3.2. Factores que regulam os receptores da vitamina D .....	22
3.2.1. Factores Hormonais.....	22
3.2.2 Efeito da idade nos receptores celulares da vitamina D.....	23
3.2.3 Efeitos da gravidez e lactação nos RCVD.....	24
3.5. Absorção intestinal de cálcio .....	24
4. Tratamento da febre do leite .....	25
5. Medidas de prevenção .....	26
5.1. Vitamina D e seus metabolitos .....	26
5.2. Gel de cálcio .....	27
5.3. Paratormona .....	27
5.4. Estratégias dietéticas.....	28

5.4.1. Balanço de cationes-aníons na dieta.....	28
5.4.2. Manipulação do estado ácido-base.....	29
5.4.3. Remoção dos cationes da dieta .....	30
5.4.4 Dieta pobre em Ca .....	30
6. O papel da Vitamina D na reprodução .....	31
6.1. Mecanismo de acção da vitamina D na reprodução .....	31
7. Cálcio e fósforo na função reprodutiva.....	32
Parte III - Estudo da hipocalcemia subclínica e do seu impacto numa exploração leiteira .....	33
1. Impacto da hipocalcemia numa exploração leiteira.....	33
2. Incidência da hipocalcemia severa e hipocalcemia subclínica .....	34
3. Ensaio clínico em vacas leiteiras.....	34
3.1 Colheita das amostras .....	35
3.2. Método de análise .....	36
3.3. Resultados obtidos .....	36
3.3.1. Produção de leite .....	37
3.3.2. Problemas reprodutivos .....	38
Conclusão .....	42
Bibliografia .....	44



## Índice de figuras

Figura 1. Distribuição das intervenções realizadas durante o período de estágio .....	5
Figura 2. Distribuição pelas várias categorias da casuística nos bovinos .....	6
Figura 3. Distribuição pelos vários aparelhos das intervenções realizadas em clínica cirúrgica nos bovinos durante o período de estágio .....	11
Figura 4. Número de vacas com valores de cálcio compreendidos entre 5,1-7,5 mg/dl, correspondendo a hipocalcemia subclínica .....	37

## Índice de quadros

Quadro 1: Intervenções de profilaxia médica realizadas em bovinos durante o período de estágio ....	6
Quadro 2: Intervenções de clínica médica realizadas nos bovinos durante o período de estágio .....	7
Quadro 3: Principais causas de intervenção no aparelho reprodutor dos bovinos.....	8
Quadro 4: Principais causas de intervenção no aparelho digestivo dos bovinos .....	8
Quadro 5: Principais causas de intervenção no aparelho respiratório dos bovinos .....	9
Quadro 6: Principais causas de intervenção no controlo reprodutivo dos bovinos .....	10
Quadro 7: Causas de intervenção devido a doenças metabólicas dos bovinos.....	10
Quadro 8: Principais causas de intervenções profiláticas nos caprinos durante o período de estágio .....	12
Quadro 9: Causas de intervenções médicas nos caprinos durante o período de estágio.....	12
Quadro 10: Principais causas de intervenções cirúrgicas nos caprinos durante o período de estágio .....	12
Quadro 11: Metabolismo do cálcio na vaca leiteira. PTH = Paratormona; 1,25 D = 1,25 dihidroxivitamina D .....	19
Quadro 12: Necessidades e exportação de Cálcio e de Fósforo na vaca gestante e lactante. (Jorgensen N.A. 1983) .....	19
Quadro 13: Número de receptores da vitamina D não ocupados no tecido intestinal de ratos e vacas em vários estados fisiológicos.....	24
Quadro 14: Valores séricos de cálcio e fósforo.....	36
Quadro 15: Produção leiteira em litros das vacas submetidas a medições dos níveis de Ca e P .....	38
Quadro 16: Data do parto das vacas submetidas a medições de cálcio e da inseminação artificial (IA) após o parto.....	39
Quadro 17: Número de dias da 1.ª inseminação artificial após o parto e das restantes até à concepção .....	40

## **Lista de abreviaturas**

PTH – Paratormona  
DCA – Diferença catiões-aniões  
RCVD – Receptores celulares para vitamina D  
FR – Frequência relativa  
CRB – Complexo respiratório bovino

## **Lista de símbolos**

Ca – Cálcio  
 $\text{CaCl}_2$  – Cloreto de cálcio  
P – Fósforo  
K – Potássio  
Mg – Magnésio

## **Nota prévia**

Terminado o percurso académico na Faculdade de Medicina Veterinária, é-nos proposta uma nova etapa de formação para concluir o mestrado integrado: o estágio curricular obrigatório. O estágio é um período durante o qual temos a hipótese de pôr à prova todos os conhecimentos adquiridos ao longo dos cinco anos do curso na faculdade e que nos permite também obter um sentido mais prático e aplicado da profissão.

O estágio curricular foi realizado com ruminantes, na zona de Salvaterra de Magos, com o médico veterinário Dr. João Guilherme Paisana.

Além das intervenções veterinárias levadas a cabo, houve um interesse particular numa área que cada vez mais assume uma importância fulcral: a gestão pecuária. Uma boa gestão pecuária de um efectivo permite ao produtor rentabilizar ao máximo o seu negócio e, por outro lado, abre um novo leque de hipóteses para o médico veterinário se afirmar em relação aos seus pares, tendo em conta que o meio em que trabalha é cada vez mais competitivo.

O objecto de estudo desta dissertação é a hipocalcemia subclínica, uma doença muito comum nas vacas leiteiras no período pós-parto.

Esta dissertação organiza-se em três partes: casuística; revisão bibliográfica e estudo de caso (em concreto sobre a hipocalcemia subclínica e o seu impacto numa exploração leiteira).

Na Parte I, após um brevíssimo relance sobre a casuística em geral, descreve-se com algum pormenor a casuística dos bovinos a partir do trabalho de campo sobre a amostra estudada.

Aborda-se então a profilaxia médica, a clínica médica (partir dos vários aparelhos animais – reprodutor, digestivo, respiratório e músculo-esquelético – assim como do controlo reprodutivo, da glândula mamária e das doenças metabólicas) e a clínica cirúrgica. Esta parte termina com um breve relance sobre a casuística dos caprinos. Os caprinos foram também considerados nesta dissertação devido ao número de intervenções realizadas ao longo do estágio, que perfazem um total de 135 intervenções

Na Parte II, procede-se a uma revisão bibliográfica que aborda os aspectos gerais da anatomia e da fisiologia, a vitamina D, o metabolismo do cálcio na febre do leite, o tratamento desta doença, as medidas preventivas e as estratégias dietéticas.

Na Parte III, descreve-se todo o processo inerente ao desenvolvimento do estudo de caso, impacto da doença e sua incidência (nas duas versões de que se pode revestir: hipocalcemia severa e subclínica), colheita das amostras, análises, resultados obtidos, problemas para a produção de leite e para a reprodução animal. O estudo materializou-se num ensaio clínico realizado a partir de amostras sanguíneas de 12 animais, para se

determinar a ocorrência de hipocalcemia no efectivo, tal como outros aspectos, a saber: a sua gravidade e os efeitos da patologia, nomeadamente, na produção de leite, no tipo de parto e na performance reprodutiva (número de serviços, dias em aberto, etc.)

## Introdução

A maioria das vacas leiteiras experimenta algum grau de hipocalcemia durante o período pós-parto. Há, contudo, um grupo delas que não consegue manter a capacidade de regular a homeostasia do Ca plasmático e, conseqüentemente, sofre uma hipocalcemia severa. Esta condição é conhecida como febre do leite e geralmente ocorre em vacas a partir da segunda lactação.

Sendo a febre do leite uma doença metabólica associada ao parto das vacas leiteiras e ao início da lactação, é caracterizada por níveis de Ca no sangue baixos e por níveis de fósforo (P) normais ou baixos (Boda & Cole, 1995). Várias pesquisas mostraram que a febre do leite não resulta de uma produção inadequada de hormonas calcitróficas (paratormona e vitamina D), mas é mais provável que resulte de uma deficiente quantidade de receptores e também da sua disfunção nas células alvo destas hormonas (Horst *et al.*, 1994).

O Ca é necessário para o funcionamento normal de uma grande variedade de tecidos e de processos fisiológicos. Por exemplo, é necessário para a formação do osso, a contracção muscular, a transmissão nervosa, a coagulação sanguínea e como segundo mensageiro regulador da acção de várias hormonas (Horst, 1986).

Em geral, os vertebrados mantêm o Ca em parâmetros bastante bem regulados. As vacas leiteiras são a excepção após a primeira lactação, principalmente durante o período que se segue ao parto. A hipocalcemia da febre do leite resulta de uma disfunção dos mecanismos homeostáticos necessários para a reposição do Ca perdido do *pool* extracelular no início da lactação (Horst, 1986).

A dieta e o tecido ósseo são as fontes primárias de Ca nos mamíferos e nas aves (DeLuca, 1984). O aumento da absorção de Ca no intestino e a sua reabsorção no osso são processos que estão sob o controlo de hormonas reguladoras deste elemento, a paratormona (PTH), que é segregada pela glândula paratiróide, e a 1,25-dihidroxitamina D [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ], que é produzida no rim (DeLuca, 1984). Como muitas desordens endócrinas resultam de deficiências ou de excessos hormonais, primariamente pôs-se a hipótese de a febre do leite resultar de uma deficiência na secreção da PTH ou da dihidroxivitamina D. Contudo, esta hipótese deixou de ser considerada quando várias investigações revelaram que os níveis sanguíneos de PTH e de dihidroxivitamina D eram superiores em vacas que apresentavam febre do leite (Horst *et al.*, 1978).

A febre do leite está associada à perda de tónus muscular, distócia, prolapso uterino, retenção placentária, endometrite, infertilidade, mamite, deslocamento do abomaso e cetose (Houe *et al.*, 2001), estando a hipocalcemia subclínica associada aos mesmos problemas mas em menor grau. Este impacto da hipocalcemia subclínica, que é muito mais

comum do que a febre do leite, pode, no entanto, ser muito importante e significativo nos efectivos de vacas leiteiras (Horst *et al.*, 1994).

A hipocalcemia subclínica em explorações de alta produção de leite tem uma elevada incidência no primeiro dia após o parto e leva a um aumento do risco de doenças que afectam a fertilidade e a produção de leite. As perdas económicas destas doenças derivam das doenças em si e das perdas associadas à diminuição da performance futura e do bem-estar animal (Hernández *et al.*, 2009). Block e Beede *et al.* (1991) descobriram que a adição de dietas aniónicas nas vacas em pré-parto aumentava a lactação subsequente em cerca de 327 a 486 kg de leite por vaca. Também foi demonstrado que a taxa de concepção 150 dias após o parto sofria um aumento significativo em vacas alimentadas com este tipo de dietas. As vacas submetidas a estas dietas aniónicas apresentaram uma menor incidência de retenção placentária (Oetzel *et al.*, 1988) assim como uma redução da incidência do edema do úbere (Lema *et al.*, 1992).

## Parte I – Período de Estágio

### 1. Introdução

O estágio foi efectuado no Ribatejo, região onde a agricultura é um dos principais meios de subsistência de grande parte das populações, assumindo, assim, um papel fulcral nas suas vidas. A par da agricultura, a pecuária está directamente ligada aos meios de sustento de uma parte igualmente significativa da população, através de produtos como a carne e o leite, entre outros.

Entre as espécies animais predominantes nesta zona do país encontram-se os bovinos, as cabras de leite, os equinos e, em menor quantidade, os suínos.

As espécies em que me concentrei durante o período de estágio foram a dos bovinos e a dos caprinos de leite, sobre as quais apresento a seguir um breve resumo da casuística.

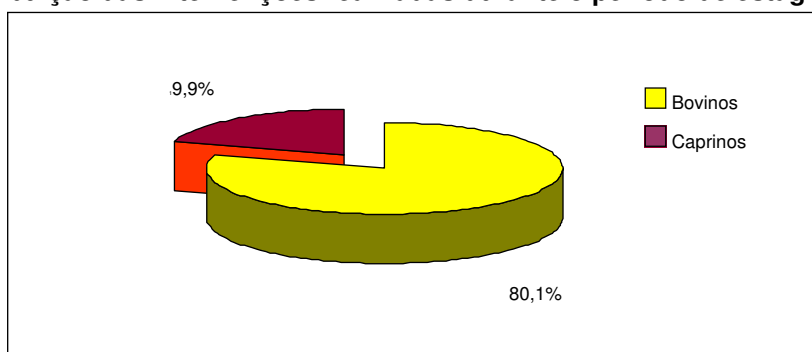
### 2. Casuística

As intervenções efectuadas durante o estágio ocorreram essencialmente em bovinos e em caprinos de leite, num total de 679 casos, 544 em bovinos e 135 em caprinos. Este valor refere-se ao número de vezes que foi necessário efectuar uma intervenção veterinária em um ou mais animais.

A espécie que necessitou de maior número de intervenções foi a bovina, com uma percentagem de 80,1%, cabendo à caprina os restantes 19,9%, como se pode verificar na Figura 1, onde se apresenta a distribuição da casuística total em percentagens dessas intervenções em cada espécie.

Tanto a análise casuística total como as parcelares que a seguir se apresentam são expressas através do parâmetro frequência absoluta (FA), em números absolutos, e do parâmetro frequência relativa (FR), em percentagem.

**Figura 1. Distribuição das intervenções realizadas durante o período de estágio**



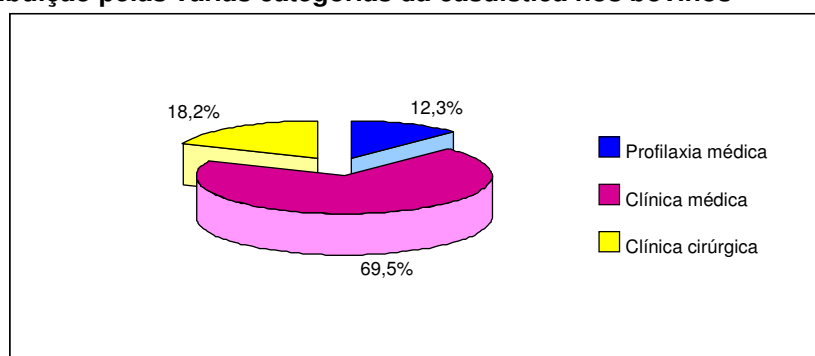
A casuística de cada espécie vai ser apresentada de uma forma mais detalhada a partir das várias áreas de intervenção.

## 2.1 Casuística dos bovinos

As intervenções realizadas nesta espécie foram levadas a cabo na sua totalidade em bovinos com aptidão leiteira, nomeadamente na raça Holstein-Frísia.

Para melhor percepção dessas intervenções irei apresentá-las agrupadas nas seguintes categorias: profilaxia médica, clínica médica e clínica cirúrgica. Os seus valores absolutos são, respectivamente, 67, que corresponde a 12,3%, 378, que corresponde a 69,5%, e 99, que corresponde a 18,2% da totalidade das intervenções efectuadas.

**Figura 2. Distribuição pelas várias categorias da casuística nos bovinos**



### 2.1.1. Profilaxia médica

A profilaxia médica na região onde decorreu o estudo está muito direccionada para as patologias do sistema respiratório e da glândula mamária. Muitos produtores pedem, portanto, a intervenção do médico veterinário para este tipo de patologias. Esta constatação geral pode ser confirmada pelo tipo de intervenções profiláticas registadas no Quadro 1, referentes ao estudo realizado no âmbito desta dissertação.

**Quadro 1: Intervenções de profilaxia médica realizadas em bovinos durante o período de estágio**

Intervenções profiláticas	Frequências absolutas	Frequências relativas (%)
Desparasitação	10	14,9
Vacinação para mastite	23	34,4
Vacinação BVD tipo I	20	29,8
Vacinação para o CRB	14	20,9
<b>TOTAL</b>	<b>67</b>	<b>100,0</b>



### 2.1.2. Clínica médica

As intervenções médicas nos bovinos abrangeram uma quantidade variável de sistemas de órgãos, a Glândula mamária e ainda o Controlo reprodutivo e as Doenças metabólicas, intervenções que acontecem no âmbito dos sistemas referidos, como se pode verificar no Quadro 2.

Essas intervenções foram agrupadas do seguinte modo: aparelho reprodutor; aparelho digestivo; aparelho músculo-esquelético; aparelho respiratório; glândula mamária; controlo reprodutivo; doenças metabólicas.

O aparelho reprodutor e o controlo reprodutivo, com 50,8% de frequências relativas, representam a maior parte das intervenções médicas, sendo seguidos pelo aparelho digestivo, com 20,3%.

**Quadro 2: Intervenções de clínica médica realizadas nos bovinos durante o período de estágio**

Sistemas de órgãos/órgão	Frequências absolutas	Frequências relativas (%)
Aparelho reprodutor	90	23,8
Aparelho digestivo	77	20,3
Aparelho músculo-esquelético	7	1,9
Aparelho respiratório	25	6,6
Glândula mamária	18	4,8
Controlo reprodutivo	136	36,0
Doenças metabólicas	25	6,6
TOTAL	378	100,0

De seguida, nos Quadros 3 a 7, serão apresentadas as patologias agrupadas a partir de cada um das categorias referidas anteriormente.

#### 2.1.2.1. Aparelho reprodutor

Este foi o sistema de órgãos que depois do Controlo reprodutivo apresentou uma maior percentagem de intervenções consideradas na clínica médica dos bovinos (23,8%) correspondendo a 90 intervenções.

Ao longo do estágio surgiram casos de anestro, indução de parto, manobras obstétricas, prolapso uterino, prolapso vaginal, retenção placentária e torção uterina, como se pode verificar no Quadro 3.

**Quadro 3: Principais causas de intervenção no aparelho reprodutor dos bovinos**

<b>Aparelho reprodutor</b>	<b>Frequências absolutas</b>	<b>Frequências relativas (%)</b>
Anestro	34	37,8
Endometrite	14	15,6
Indução do parto	3	3,3
Manobras obstétricas	7	7,8
Prolapso uterino	4	4,4
Prolapso vaginal	2	2,2
Retenção placentária	24	26,7
Torção uterina	2	2,2
<b>TOTAL</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>

### 2.1.2.2. Aparelho digestivo

O aparelho digestivo apresenta a terceira percentagem mais elevada do total das intervenções médicas apresentadas na casuística (20,3%), correspondendo a 77 intervenções, não deixando, no entanto, de ter significado devido ao elevado número de casos que surgiram no decurso da prática clínica.

O Quadro 4 apresenta as patologias do aparelho digestivo que tive oportunidade de diagnosticar e de tratar.

**Quadro 4: Principais causas de intervenção no aparelho digestivo dos bovinos**

<b>Aparelho digestivo</b>	<b>Frequências absolutas</b>	<b>Frequências relativas (%)</b>
Timpanismo espumoso	3	3,9
Deslocamento do abomaso à direita	10	13,0
Diarreia dos vitelos	25	32,5
Indigestão vaginal	9	11,7
Retículo-peritonite traumática	1	1,3
Deslocamento do abomaso à esquerda	29	37,6
<b>TOTAL</b>	<b>77</b>	<b>100,0</b>

Neste quadro pode verificar-se que a patologia do aparelho digestivo com maior frequência relativa foi o deslocamento do abomaso à esquerda, patologia que ocorre com muita frequência nas explorações de vacas de leite devido, principalmente, ao tipo de gestão clínica e manejo alimentar.

### 2.1.2.3. Aparelho músculo-esquelético

De entre as várias patologias do aparelho músculo-esquelético dos bovinos a única em que foi necessário algum tipo de intervenção médica foi a podal, tendo sido realizadas 7 intervenções.

### 2.1.2.4. Aparelho respiratório

De entre as patologias do foro respiratório dos bovinos a pneumonia assume a maior frequência, com 22 casos (vitelos, novilhos e adultos), que correspondem a 88,0%. Foram ainda abordados mais 3 casos de edema pulmonar, que correspondem a 12 %.

**Quadro 5: Principais causas de intervenção no aparelho respiratório dos bovinos**

<b>Aparelho respiratório</b>	<b>Frequências absolutas</b>	<b>Frequências relativas (%)</b>
Edema pulmonar	3	12,0
Pneumonia em adultos	5	20,0
Pneumonia em novilhos	11	44,0
Pneumonia em vitelos	6	24,0
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>	<b>100,0</b>

### 2.1.2.5. Glândula mamária

As patologias relacionadas com a glândula mamária mais observadas foram a mastite e a lesão do teto. A mastite foi a patologia com maior relevância, com 12 casos observados, correspondendo a 66,7% do total de casos.

De entre os vários factores que contribuíram para o desenvolvimento de mastite, podemos enunciar que os mais comuns foram a falta de higiene dos estábulos, os erros na ordenha e o mau funcionamento das respectivas máquinas.

A terapêutica escolhida para cada caso prendeu-se com as características do leite colhido, o grau de reacção do úbere, as alterações sistémicas e, principalmente, através do isolamento do agente responsável.

### 2.1.2.6. Controlo reprodutivo

O Controlo reprodutivo não foi associado ao grupo das patologias do aparelho reprodutor, pois nenhuma das intervenções efectuadas resulta de uma patologia que necessite de diagnóstico ou tratamento, apesar de ser considerado um acto médico veterinário.

As 136 intervenções médicas efectuadas no seu âmbito demonstram a importância que lhe é dada por parte do médico veterinário nas explorações, que pode ser determinante para o êxito destas.

O Quadro 6 apresenta os 3 tipos de intervenções realizadas nas explorações de bovinos leiteiros para que se consiga o manejo reprodutivo adequado às necessidades.

**Quadro 6: Principais causas de intervenção no controlo reprodutivo dos bovinos**

<b>Controlo reprodutivo</b>	<b>Frequências absolutas</b>	<b>Frequências relativas (%)</b>
Diagnóstico de gestação	40	58,8
Indução de cio	10	14,7
Inseminação artificial	18	26,5
<b>TOTAL</b>	<b>68</b>	<b>100,0</b>

#### **2.1.2.7. Doenças metabólicas**

No grupo das doenças metabólicas a que tem mais relevância, como se mostra no Quadro 7, é a hipocalcemia que constitui o tema principal da presente dissertação e da qual falaremos à frente mais pormenorizadamente. A cetose e o fígado gordo, apesar de apresentarem uma frequência relativa mais baixa do que a hipocalcemia, não deixam, contudo, de ser patologias importantes, pois põem em risco a vida dos bovinos.

**Quadro 7: Causas de intervenção devido a doenças metabólicas dos bovinos**

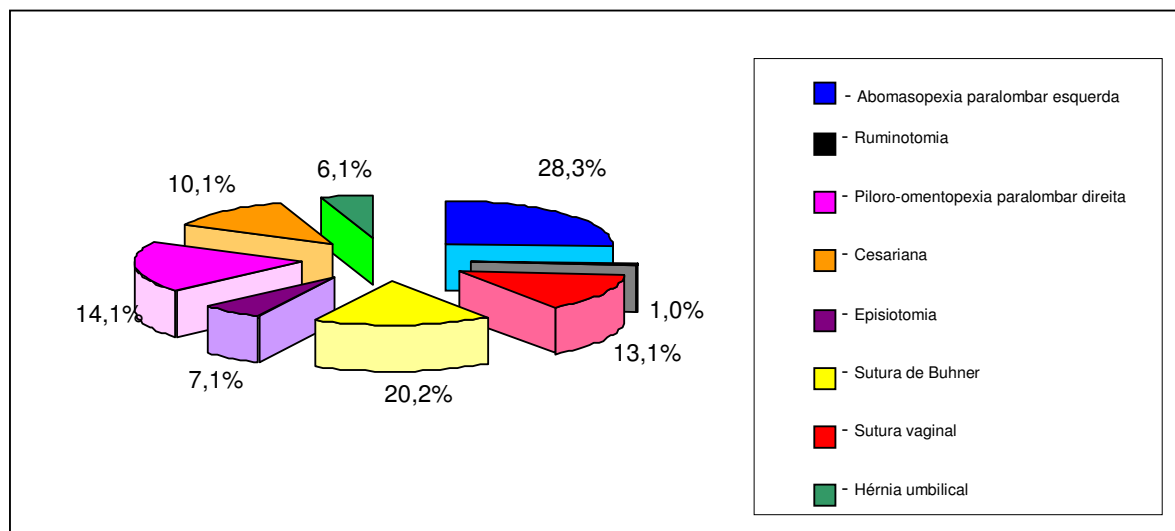
<b>Doenças metabólicas</b>	<b>Frequências absolutas</b>	<b>Frequências relativas (%)</b>
Cetose	5	20,0
Fígado gordo	2	8,0
Hipocalcemia	18	72,0
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>	<b>100,0</b>

Terminamos assim a análise casuística da clínica médica passando de seguida à análise da casuística da clínica cirúrgica.

#### **2.1.3 Clínica cirúrgica**

Na Figura 3 podemos observar os diversos tipos de cirurgias efectuadas nos bovinos ao longo do estágio, que representam 18,0% das intervenções realizadas nos bovinos.

**Figura 3. Distribuição pelos vários aparelhos das intervenções realizadas em clínica cirúrgica nos bovinos durante o período de estágio**



Grande parte destas cirurgias está relacionada com o aparelho reprodutor na altura do parto e entre elas podemos enumerar as seguintes: a cesariana; a episiotomia; a sutura de Buhner e a sutura vaginal. A realização de cesarianas foi devido aos partos distócicos, por desproporção feto-materna; a episiotomia foi necessária, na maioria das vezes, devido à ausência de dilatação vaginal, que também está relacionada com o número elevado de suturas vaginais, estando estas, por sua vez, associadas ao mau maneio e à má técnica utilizada pelos produtores ao tentarem ajudar as vacas com dificuldades em parir.

O aparelho digestivo foi também um bom alvo dos bisturis, pois as cirurgias como a abomasopexia paralombar esquerda, a ruminotomia e a píloro-omentopexia paralombar direita são cirurgias que se realizam com muita frequência nas explorações leiteiras devido às patologias associadas à alimentação.

## **2.2. Casuística dos caprinos**

Os caprinos foram também considerados neste estudo devido ao número de intervenções realizadas ao longo do estágio, que perfazem um total de 135. Os caprinos são uma das espécies de ruminantes em que se tem notado um aumento do número de intervenções dos médicos veterinários nas explorações, devido à crise que o sector leiteiro bovino atravessa, a qual tem levado os produtores a apostarem nesta espécie porque o preço do leite de cabra tem uma cotação por litro superior à do leite dos bovinos.

A estrutura adoptada para a apresentação das intervenções efectuadas nos caprinos é semelhante à estrutura das intervenções nos bovinos, mas não tão pormenorizada devido à percentagem de casos ser bastante inferior.

Assim, as várias intervenções estão agrupadas em três quadros organizados em torno de três temas principais: profilaxia médica; clínica médica e a clínica cirúrgica.

Pode verificar-se, através da análise conjunta dos Quadros 8, 9 e 10, que a profilaxia médica tem o maior peso no número de intervenções realizadas nos caprinos. Este número deve-se ao facto de que através das acções profiláticas executadas se consegue prevenir várias patologias nas explorações de caprinos.

A profilaxia médica nas explorações intensivas é uma intervenção de elevada importância devido, quer à densidade populacional apresentada nas mesmas, quer ao impacto económico que as doenças têm junto dos produtores. Assim, consegue-se prevenir as doenças que se propagam de animal para animal e manter uma boa relação entre o custo e o benefício.

O presente e futuro da medicina humana e veterinária poderá passar por acções de carácter preventivo e não apenas pelo tratamento das doenças.

**Quadro 8: Principais causas de intervenções profiláticas nos caprinos durante o período de estágio**

<b>Profilaxia médica</b>	<b>Frequências absolutas</b>	<b>Frequências relativas (%)</b>
Desparasitação	20	26,7
Vacinação	55	73,3
<b>TOTAL</b>	<b>75</b>	<b>100,0</b>

**Quadro 9: Causas de intervenções médicas nos caprinos durante o período de estágio**

<b>Clínica médica</b>	<b>Frequências absolutas</b>	<b>Frequências relativas (%)</b>
Desidratação	10	20,0
Diarreia	4	8,0
Indigestão	2	4,0
Linfadenite caseosa	34	68,0
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>100,0</b>

**Quadro 10: Principais causas de intervenções cirúrgicas nos caprinos durante o período de estágio**

<b>Clínica Cirúrgica</b>	<b>Frequências absolutas</b>	<b>Frequências relativas (%)</b>
Prolapso uterino	2	20,0
Drenagem de abscesso	6	60,0
Cesariana	2	20,0
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>

## **Parte II – Revisão Bibliográfica**

### **1. Aspectos gerais de anatomia e fisiologia**

#### **1.1. Anatomia da glândula mamária**

O parênquima da glândula mamária, ou as células secretoras de leite, desenvolvem-se através da proliferação das células epiteliais provenientes do cordão mamário primário. As células epiteliais formam estruturas ocas circulares, chamadas alvéolos, que são unidades secretoras fundamentais de leite na glândula mamária.

Os sistemas de ductos ligam os alvéolos aos tetos permitindo ao leite passar da área de síntese para a área de libertação (tetos). Os ductos convergem de forma a se unirem todos num único, que apresenta a abertura no teto (Klein, 1997) .

Os alvéolos são agrupados em unidades conhecidas como lóbulos, cada um envolvido por um septo distinto de tecido conjuntivo. Os lóbulos são agrupados em unidades maiores denominadas lobos, que estão rodeadas por septos de tecido conjuntivo.

Os alvéolos são revestidos por células contrácteis de natureza mioepitelial e que estão relacionadas com o reflexo de ejeção de leite. As células mioepiteliais também de localizam ao longo dos ductos.

#### **Sistema colector do leite**

O teto dos bovinos tem uma pequena cisterna no final da sua extremidade. Irradiando-se para cima existe uma estrutura conhecida como roseta de Furstenberg, formada por 7 a 8 dobras de camadas duplas de epitélio e de tecido conjuntivo subjacente. Nos bovinos a estrutura primária responsável pela retenção do leite é um esfíncter muscular que rodeia o canal do teto.

#### **1.2. Lactogénese**

A lactogénese é um processo de diferenciação pelo qual as células alveolares mamárias adquirem a capacidade de secretar o leite. O primeiro estágio consiste na diferenciação parcial enzimática e citológica das células alveolares e coincide com a secreção limitada de leite antes do parto. O segundo estágio começa com a secreção copiosa de todos os componentes do leite pouco antes do parto e permanece durante um período alargado de tempo após o mesmo. A secreção mamária depende do número de células secretoras de leite e da sua capacidade de síntese.

A última fase da diferenciação mamária (crescimento lóbulo-alveolar) ocorre principalmente na segunda metade da gestação e é geneticamente determinada e controlada pela progesterona, prolactina, estrogénio, somatotropina bovina (BST) e outras hormonas (Forsyth, 1986). O desaparecimento da progesterona faz iniciar o desenvolvimento mamário na presença de prolactina e de glicocorticóides.

A prolactina desempenha uma função muito importante na secreção de leite. Esta hormona é libertada quando se manipula o teto, sempre que se ordenha a vaca ou quando o vitelo mama. Os estímulos sensoriais são conduzidos até ao hipotálamo, onde a síntese de dopamina, o principal inibidor da secreção de prolactina, é bloqueada enquanto os neurónios do núcleo paraventricular são estimulados a produzir o péptido intestinal vasoactivo, um estimulante da libertação de prolactina.

Outra hormona necessária à produção de leite nos ruminantes é a hormona de crescimento (Klein, 1997).

A síntese do leite consiste no somatório de diversas reacções químicas que têm lugar nas células alveolares mamárias durante a lactação. Durante o pico de lactação, a glândula mamária sintetiza e secreta uma prodigiosa panóplia de constituintes tais como proteínas, carboidratos, lípidos, água e iões (Bauman *et al.*, 2006).

Uma das consequências do início da lactação é o considerável aumento da ingestão de alimentos e de água, aumento que é acompanhado pela hipertrofia do tracto intestinal para permitir a absorção mais célere de nutrientes, de modo a compensar o défice energético em que o animal se encontra. Uma vaca a produzir cerca de 12 kg/d de leite usa em média 50% dos nutrientes disponíveis para a síntese do mesmo, enquanto que se a produção leiteira aumentar para 22 kg/d a percentagem de utilização de nutrientes passa a ser de 66%.

Também há uma hipertrofia da glândula mamária, do fígado e do coração. As necessidades do tecido periférico são reduzidas para garantir a disponibilidade adequada de nutrientes para a síntese do leite. Esse equilíbrio metabólico entre a glândula mamária e os nutrientes corporais é regulado pelo sistema nervoso central.

As células epiteliais mamárias em lactação são altamente diferenciadas. As proteínas de exportação, sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER), são modificadas no aparelho de Golgi onde a maioria dos constituintes não gordurosos do leite são adicionados. As vesículas secretórias têm origem neste aparelho para carregar os componentes do leite para a superfície da célula. A lactose, a síntese de ácidos gordos e a activação dos aminoácidos ocorrem no citoplasma da célula. Na mitocôndria ocorre a transferência de energia dos substratos oxidáveis em ATP, assim como a síntese do citrato e dos compostos usados na síntese de aminoácidos não essenciais. Nos ribossomas ocorre a síntese das proteínas do leite a partir dos aminoácidos presentes. Os lisossomas contêm enzimas hidrolíticas e desempenham um papel principal na destruição celular



durante a involução do tecido mamário dos ruminantes, principalmente durante o período seco da lactação.

Na síntese da porção lipídica do leite estão envolvidas muitas reacções enzimáticas diferentes incluindo o transporte, activação e desnaturação dos ácidos gordos, a síntese do triacilglicerol e ainda a formação das “droplets” de gordura no leite (Clegg et al., 2001).

O propionato e o acetato são as principais fontes de energia nos ruminantes. O acetato, e em menor grau o ácido butírico, são considerados os mais importantes metabolitos energéticos no metabolismo da glândula mamária nos ruminantes.

### **1.3. Ciclo da lactação**

A lactação pode ser dividida em 4 fases distintas e dura em média cerca de 305 dias. A Fase 1 (Início da lactação) inicia-se com o parto e prolonga-se até cerca dos 70 dias após o mesmo e apresenta-se com um aumento rápido da produção leiteira durante este período, atingindo o pico por volta das 8 a 12 semanas após o nascimento da cria. Nesta fase, a ingestão do alimento não consegue acompanhar a demanda nutricional para a produção de leite, especialmente no que diz respeito à energia, tornando-se necessário para a vaca recorrer às reservas corporais de modo a fazer face ao défice energético característico desta fase.

A Fase 2 corresponde ao período designado por Pico da lactação e dura cerca de 10 semanas. O pico da lactação é atingido normalmente por volta dos 90 dias e após a sua ocorrência a curva de lactação tende a ser decrescente. As vacas devem ser mantidas no pico de produção o maior tempo possível já que neste período a produção é máxima e a capacidade de ingestão possibilita a supressão das necessidades nutricionais.

A Fase 3 corresponde ao período que vai desde os 140 dias após o parto até à secagem e representa-se por uma diminuição da produção com correspondentes reflexos na curva de lactação, fisiologicamente a vaca estará gestante e a capacidade de ingestão facilmente alcançará ou mesmo ultrapassará as necessidades do animal. No final da Fase 3 a produção leiteira está em níveis baixos e é nessa altura que os animais são forçados a cessá-la para serem preparados para a próxima lactação, sendo o procedimento mais usual deixarem de ser ordenhados. A pressão retrógrada exercida dentro do alvéolo, causada pelo leite, inibe gradualmente a secreção deste pelas células epiteliais alveolares e pequenos ductos. O processo é denominado de involução e, frequentemente, requer pelo menos 1 mês, havendo a necessidade de um período mínimo de 6 semanas de intervalo entre lactações. A esta fase dá-se o nome de Fase 4 e corresponde ao Período Seco ou de Secagem. Dentro de um período de 1 a 2 meses, o sistema secretor (alvéolos) e o excretor (ductos) regredem e são substituídos (Klein, 1997).

## 2. Metabolismo do cálcio na febre do leite

A febre do leite é uma desordem metabólica complexa que ocorre no início da lactação dos bovinos. Os sinais clínicos da doença incluem a inapetência, a tetania, a inibição de urinar e de defecar, o decúbito lateral e, eventualmente, o coma e a morte se o animal não for tratado. A marca desta patologia é a severa hipocalcemia que, provavelmente, é a causa da maioria dos sinais da febre do leite. Vários factores têm sido consistentemente associados ao aumento da incidência desta doença, incluindo o parto, o início da lactação, a idade avançada, a raça e a dieta (Horst *et al.*, 1986).

O ião cálcio desempenha um papel fundamental nos processos biológicos de excitação neuromuscular, coagulação sanguínea, actividade enzimática, excitação nervosa, libertação hormonal, permeabilidade das membranas celulares e ainda é um componente estrutural do esqueleto. Daí que o controlo do ião cálcio nos tecidos extracelulares seja de importância vital para a saúde animal (Wu, Liu, Xu, & Ye, 2008).

O osso contém cálcio permutável que está em equilíbrio com a concentração sérica de cálcio, assim que existem pequenas variações na concentração sérica de cálcio o controlo é feito numa primeira fase sem a acção da paratormona (PTH) e calcitonina (CT), através da permuta de cálcio com o osso (Guyton & Hall, 2000). Este cálcio encontra-se no osso sob a forma de sais, principalmente  $\text{CaHPO}_4$  (fosfato bicálcico) e outros sais de cálcio amorfos (Guyton & Hall, 2000).

O início da lactação da vaca leiteira cria uma necessidade repentina de grandes quantidades de cálcio. O colostro, leite secretado inicialmente, é especialmente rico neste elemento comparativamente com o leite secretado uns dias mais tarde. Estes factores predispõem as vacas a desenvolver um estado de hipocalcemia bastante acentuado, que as leva a desenvolverem a chamada febre do leite (Arnaud *et al.*, 1971). Num estudo realizado por Littledike (1976), este autor correlacionou estas duas ocorrências: o início da lactação e a hipocalcemia nas vacas. Assim, o que aconteceu com 76 vacas envolvidas no estudo foi uma queda acentuada nos níveis de cálcio logo após o início da ordenha, seguida de uma subida imediata desses níveis após a paragem desta, isto para valores superiores aos do período do pré-parto (Littledike, 1976). O máximo da hipocalcemia ocorreu cerca de 72 horas após o início da ordenha. Durante os períodos em que a vaca sofreu a paragem na ordenha a concentração plasmática de Ca aumentou cerca de 1 a 2 mg/100 ml em relação aos níveis plasmáticos do pré-parto (Littledike, 1976).

Esta doença é caracterizada pela queda rápida da concentração de cálcio plasmático, que resulta da sua perda para a formação de colostro. Por exemplo, uma vaca que produza 10 litros de colostro perde cerca de 23 g de Ca numa produção isolada, sendo esta quantidade cerca de 9 vezes superior à quantidade de Ca presente no *pool* plasmático da vaca (Goff *et al.*, 1997). O Ca perdido do *pool* plasmático deve ser repostado através da absorção no

intestino, através da reabsorção óssea ou de ambas as formas (Horst *et al.*, 1997). A manutenção constante da concentração plasmática de Ca durante a lactação é um desafio para a vaca leiteira. Durante a época de lactação uma vaca que produza 9000 kg de leite secreta cerca de 11,07 kg de Ca e 8,56 kg de P no leite. A maioria das vacas tem um balanço de Ca negativo nas primeiras semanas da lactação, porque este deixa o organismo através do leite, das perdas fecais endógenas e da urina; por sua vez o intestino não tem capacidade para fazer a absorção nas quantidades necessárias para a reposição dos níveis aconselháveis e também porque a dieta normalmente não é suficiente. Para manter os níveis normais de Ca no plasma o equilíbrio é mantido pela reabsorção óssea das reservas deste elemento e através da absorção intestinal.

Durante o período seco, quando as necessidades de Ca são mínimas (10 a 12 g de Ca/dia), os mecanismos de reposição do Ca plasmático estão relativamente inativos (Ramberg *et al.*, 1984). Contudo, no parto, a vaca tem de trazer para o *pool* plasmático uma quantidade igual ou superior a 30 g de Ca por dia. Como consequência desta necessidade repentina praticamente todas as vacas experimentam algum grau de hipocalcemia durante o primeiro dia após o parto, enquanto o intestino e o tecido ósseo se adaptam às necessidades da lactação. Em algumas vacas a drenagem de Ca para a glândula mamária causa um declínio nas concentrações plasmáticas e extracelulares para níveis que causam a disrupção da função neuromuscular, resultando na síndrome clínica da febre do leite (Hibbs, 1955).

Numa vaca adulta os valores de cálcio ionizado sanguíneo correspondem aproximadamente a 8,5-10,0 mg/dl, o que leva a que uma vaca de 600 kg tenha cerca de 3 g de cálcio no seu plasma (Goff, 1997; Haag & Jones, 1935). No sangue o cálcio encontra-se emparelhado a proteínas, cerca de 40 a 45%, sob a forma de complexos aniônicos de cálcio (5-10%), principalmente fosfato de cálcio, e ainda sob a sua forma livre, cerca de 50%, sendo que esta última é a componente de mais importância fisiológica (Newton & Nunamaker, 1985).

O cálcio que se difunde nos tecidos está maioritariamente na forma iónica, existindo um equilíbrio entre esta forma e a fracção ligada às proteínas do cálcio sérico, sendo a sua redistribuição entre estes dois estados um processo rápido (Armstrong *et al.*, 1952). O nível de cálcio no sangue depende do balanço entre a quantidade que entra e a quantidade que deixa o sangue.

O Ca plasmático é controlado pela coordenação de hormonas calcitróficas – a paratormona (PTH) e a 1,25-dihidroxyvitamina [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] –, ambas sintetizadas como resposta à hipocalcemia e com a função de aumentar a quantidade de Ca para o *pool* plasmático. Uma diminuição da concentração deste elemento no plasma faz a glândula paratiróide secretar PTH, que apenas em minutos aumenta a reabsorção renal de Ca através do filtrado glomerular. Logo que a diminuição na concentração de Ca de plasma for mínima, o Ca

volta aos valores normais e a secreção de PTH regressa aos níveis basais. Contudo, se a saída de Ca do plasma for grande, há uma secreção contínua de PTH que estimula também a reabsorção de Ca que está armazenado no tecido ósseo (Horst & Reinhardt, 1983).

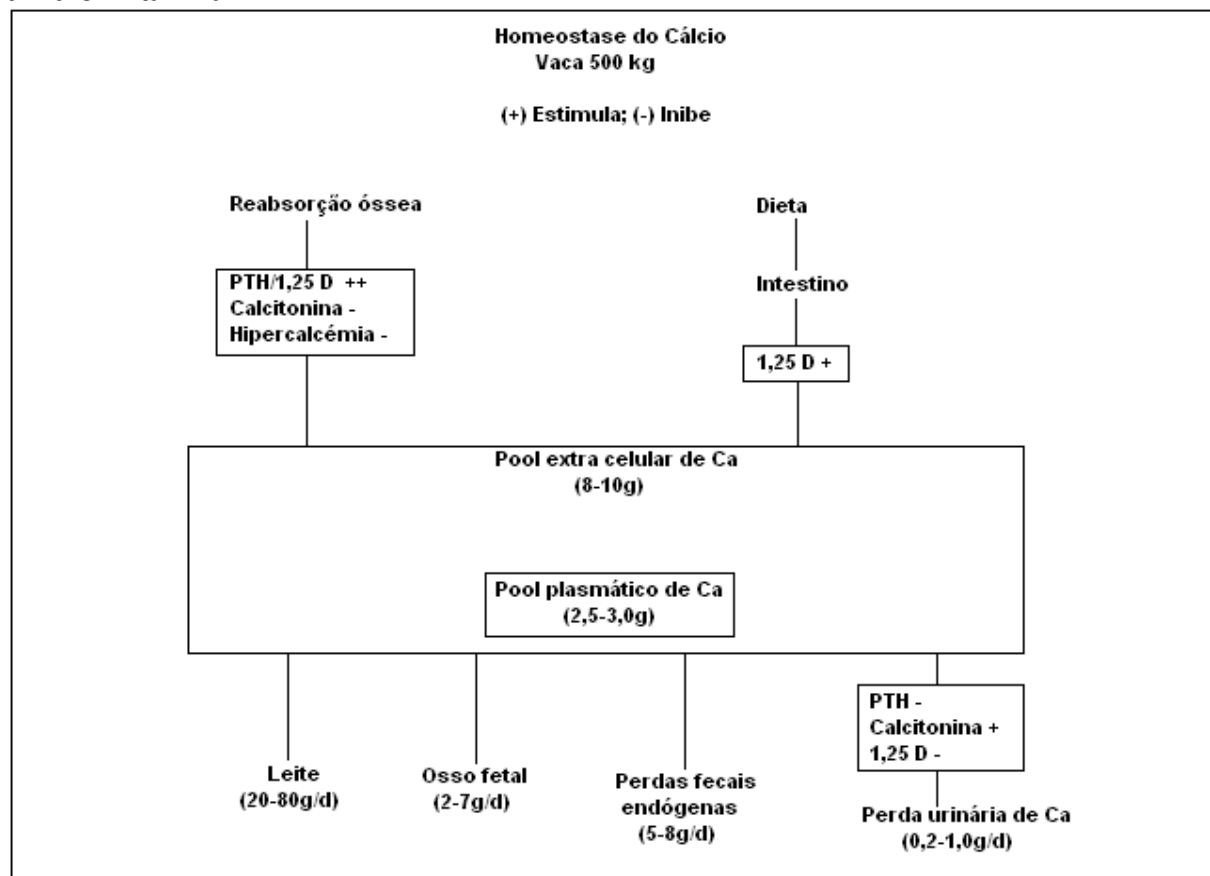
A PTH induz a enzima renal a produzir o metabolito da vitamina D  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ . Esta hormona esteróide actua sinergicamente com a PTH para aumentar a concentração de Ca através da estimulação da actividade osteoclástica e através do aumento da reabsorção renal de Ca. Contudo, a  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  é mais importante pela sua capacidade de aumentar o transporte activo do Ca através do epitélio intestinal para a corrente sanguínea. A absorção eficiente do Ca da dieta, quando este é baixo ou quando a necessidade é elevada, ocorre por transporte activo através do epitélio intestinal. Este processo necessita da vitamina  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ , a qual estimula a produção de proteínas que se ligam ao Ca e a proteínas transportadoras através da membrana. Uma vez transportado para a membrana basolateral do epitélio intestinal, o Ca é extrudido da célula através de um gradiente de concentração dependente da Ca-ATPase, que também é aumentado pela  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  (Bronner, 1987).

A calcitonina é uma hormona peptídica secretada pelas células C da tiróide, e tem como função reduzir a concentração de cálcio nos fluidos extracelulares, ou seja, tem uma forma de acção antagónica à da PTH (Guyton & Hall, 2000). No entanto o papel da CT na regulação da concentração de cálcio parece ser menos importante comparando ao da PTH (Guyton & Hall, 2000).

O estímulo para a secreção de calcitonina é o aumento na concentração de cálcio nos fluidos extracelulares (Newton & Nunamaker, 1985). Existem duas razões pelas quais a CT tem um efeito fraco na regulação do cálcio no plasma, uma é que a redução da concentração de cálcio ionizado no plasma leva a uma estimulação da secreção de PTH, que quase substitui o efeito da CT (Guyton & Hall, 2000). Outra razão é que, nos animais adultos, a taxa de mobilização e de deposição de cálcio nos ossos é pequena, levando a que uma diminuição da mobilização pela acção da CT vai ter um efeito reduzido nos níveis de cálcio ionizado no plasma (Guyton & Hall, 2000). A acção da PTH e da CT no osso são antagónicas, no entanto a nível renal são sinérgicas, promovendo a diminuição da reabsorção de fósforo (Newton & Nunamaker, 1985).

No Quadro 11 representa-se esquematicamente o metabolismo do cálcio na vaca leiteira (Horst et al., 1996) e no Quadro 12 as necessidades e exportação de Cálcio e de Fósforo na vaca gestante e lactante (Jorgensen N.A. 1974).

**Quadro 11: Metabolismo do cálcio na vaca leiteira. PTH = Paratormona; 1,25 D = 1,25 dihidroxivitamina D**



Adaptado de Horst *et al.*, (1994).

**Quadro 12: Necessidades e exportação de Cálcio e de Fósforo na vaca gestante e lactante. (Jorgensen N.A. 1983)**

(Bergensen R.A. 1988)

Estado fisiológico	Requerimentos diários ou drenagem (g)			
	Ca		P	
Vaca prenhe 450 kg				
Necessidades	25		20	
Drenagem fetal	5,3		2,2	
Vaca em lactação 400 kg				
	Manutenção	Produção	Manutenção	Produção
7 kg, 5% gordura	17	20	13	15
15 kg, 5% gordura	17	41	13	33
Vaca em lactação 400 kg				
	Drenagem na lactação			
7 kg colostro, Dia 1	13 (81)		12 (90)	
15 kg leite, Dia 10	18 (60)		17 (65)	

## 2.1 Factores predisponentes

### 2.1.1. Raça

Vários investigadores sugerem que determinadas raças de vacas são mais susceptíveis à febre do leite, particularmente a Channel Island, a Swedish Red and White e a Jersey (Kusumanti *et al.*, 1993). Não estando ainda claramente determinadas as razões exactas para este aumento de susceptibilidade. Num dos seus estudos, Goff *et al.* (1997) mostraram que os receptores intestinais para a  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  estão presentes em menor número em vacas Jersey do que em vacas Holstein, resultando esta diminuição dos receptores numa perda de sensibilidade a esta vitamina e, consequentemente, numa menor absorção de cálcio.

### 2.1.2. Idade

À medida que as vacas vão envelhecendo a incidência da febre do leite aumenta. Esta doença é muito rara na primeira lactação, aumentando drasticamente a sua incidência a partir da terceira lactação (Curtis *et al.*, 1984). Com o avanço da idade há um aumento da produção de leite e, por consequência, um aumento das necessidades de Ca juntamente com um declínio na capacidade de mobilizar o Ca onde este se encontra armazenado e um declínio do transporte activo através do intestino, assim como uma diminuição da produção de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ .

Simultaneamente mostrou-se que a C24-hydroxylase, enzima que inactiva a  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  aumenta em grandes quantidades em vacas leiteiras velhas (Jonhson *et al.*, 1995).

Assim sendo, vacas mais velhas têm maior probabilidade de desenvolver hipocalcemia, já que o processo de envelhecimento está associado à diminuição da resposta da  $1\alpha$ -hidroxilase ao stress provocado pelo défice de Ca, a uma diminuição dos receptores intestinais de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  (Divers & Peek, 2008) e ainda, no caso do tecido ósseo, existe uma diminuição do número de células capazes de responder ao estímulo hormonal (Goff *et al.* 1991).

### 2.1.3. Dieta

A manipulação do Ca e do Fósforo (P) na dieta é conhecida por ter alterações dramáticas na incidência da febre do leite (Jorgensen, 1974). Há estudos que mostraram que alimentando as vacas com baixas quantidades de Ca ou ajustando o *ratio* entre este e o P para a proporção de 2 para 1 se baixava a incidência da febre do leite (Kendall *et al.*, 1970).

Os factores dietéticos que predis põem os bovinos à ocorrência de hipocalcemia não são consensuais e existem estudos que defendem que dietas ricas em Ca aumentam a incidência de febre do leite, enquanto que outros defendem que aumentar o nível de Ca alimentar não só não causa febre do leite como pode ainda ajudar a prevenir a doença, especialmente quando em associação com dietas ricas em aniões (Goff et al., 1994).

Goff e Horst (1994) descrevem que a percentagem de K na dieta é mais importante do que a percentagem de cálcio, na prevenção da hipocalcémia. Deste modo afirmam que uma boa estratégia de prevenção da hipocalcémia é a redução da percentagem de K na dieta para valores iguais ou abaixo de 1,8%.

Assim sendo, a administração durante o período de secagem de dietas catiónicas ricas em Na e K aumentam a incidência de hipocalcemia em bovinos enquanto que dietas aniónicas ricas em Cl e S diminuem a incidência da mesma, apesar de diminuírem a palatabilidade e, consequentemente, a capacidade de ingestão de alimento no pré-parto.

### **3. Vitamina D**

#### **3.1. Metabolismo da Vitamina D<sub>3</sub>**

Da família da vitamina D, a vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) é a mais importante, sendo formada na pele pela irradiação do 7-dihidrocolesterol com radiação ultravioleta proveniente do sol (Guyton & Hall, 2000).

A activação da vitamina D<sub>3</sub> é iniciada no fígado para formar a 25-hidroxicolecalciferol [25-(OH)D<sub>3</sub>], que é a forma de vitamina D que circula em maiores quantidades no sangue e que, na vaca em estado normal, está presente no plasma em concentrações de 20 a 50 ng/ml. Concentrações inferiores a 5 ng/ml podem ser indicativas de deficiência de vitamina D; por sua vez, concentrações entre 200 e 300 ng/ml podem indicar toxicidade. A [25-(OH)D<sub>3</sub>] é hidroxilizada no rim pela enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase e é convertida na forma activa [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]. O controlo desta hidroxilação é levado a cabo por vários processos contudo, a PTH é a mais importante e efectiva peça da regulação da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase (DeLuca, 1984). A concentração de PTH é regulada pela concentração plasmática de Ca, logo, quando esta baixa para níveis inferiores a 10 mg/dl a glândula paratiroide é estimulada a produzir PTH. Por sua vez, a PTH estimula a conversão de [25-(OH)D<sub>3</sub>] no rim através da enzima 1 $\alpha$ -hydroxylase (Horst et al. 1998). Se a concentração plasmática de Ca for superior a 10 mg/dL a secreção de PTH é suprimida, assim como a produção de [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]. Na vaca adulta não gestante e não lactante a concentração desta vitamina varia entre 5 a 20 pg/ml e no termo da gestação entre 20 a 50 pg/ml. Durante o parto e o início da lactação aumenta para valores de 100 a > 300 pg/ml em casos severos de hipocalcemia.

Ambas as vitaminas, a  $[25-(\text{OH})\text{D}_3]$  e a  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ , estão sujeitas às enzimas catabólicas presentes maioritariamente no intestino e no rim (Guyton & Hall, 2000).

A hormona esteróide  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  regula a homeostase do cálcio, a proliferação e a diferenciação celular e a função imune das células; circula no sangue primariamente ligada às proteínas transportadoras da Vitamina D e cerca de 5%, um pouco menos, circula livremente no plasma sanguíneo. A forma livre desta hormona entra nas células livremente devido à sua natureza lipofílica, acumulando-se apenas em tecidos-alvo que possuam os receptores celulares para esta hormona (Guyton & Hall, 2000).

### **3.2. Factores que regulam os receptores da vitamina D**

#### **3.2.1. Factores Hormonais**

A regulação do número de receptores celulares para a vitamina D (RCVD) é outro importante mecanismo que modula a resposta à  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ , porque a actividade biológica desta vitamina nas células é proporcional ao número de RCVD. Várias hormonas (glucocorticóides, estrogénio, etc.) têm mostrado um aumento na síntese de RCVD, aumentando assim a resposta à  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  nos tecidos.

A concentração tecidual de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  determina, em parte, a resposta biológica de uma vaca a uma crise de Ca ou de stresse. Quanto maior for a concentração de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  nos tecidos maior é a resposta biológica (Costa *et al.*, 1985). Uma ressalva a este processo é que o metabolismo, ou a meia vida, da  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  tem um papel muito importante na magnitude da resposta biológica dos tecidos à hormona (Reinhardt & Horst, 1989). Em adição à estimulação da síntese de proteínas reguladoras do Ca, a  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  estimula a síntese de enzimas responsáveis pela sua inactivação. Contudo, tem sido proposto que enzimas degradativas, como as vitaminas  $\text{D}_{23}$  e  $\text{D}_{24}$  hidroxilases, podem ser importantes reguladoras de uma resposta celular à  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  devido à sua capacidade para transformar esta vitamina na sua forma inactiva (Haussler *et al.*, 1988). Horst *et al.* (1990) demonstraram que a síntese de RCVD, através da  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ , é paralelo ao aumento das hidroxilases marcadas. O resultado foi que o aumento do número do RCVD não levou ao aumento da resposta celular porque estas enzimas conseguem inactivar as hormonas tão rapidamente como as hormonas entram nas células provocando um declínio na ligação aos RCVD e, conseqüentemente, termina a resposta biológica (Reinhardt & Horst, 1989). Uma verdadeira amplificação da resposta biológica à  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  é observada só se estas enzimas forem inibidas por análogos da vitamina D ou quando os RCVD forem regulados por hormonas ou estados fisiológicos (gravidez ou lactação) que não induzem enzimas degradativas (Reinhardt & Horst, 1990).



Em contraste com os estudos efectuados, foi demonstrado que as elevações (endógenas) de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  no plasma, através da restrição de Ca na dieta, não resultam numa regulação dos RCVD intestinais e renais mediada pela  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  (Goff *et al.*, 1990). Estes autores sugeriram que o hiperparatiróidismo secundário à dieta deficiente em Ca podia ser responsável pela deficiente regulação dos RCVD. Estudos posteriores demonstraram que a PTH podia regular negativamente por si só os RCVD (Reinhardt & Horst, 1990). Isto sugere que a regulação positiva dos RCVD, através da  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  é relevante apenas durante o tratamento com compostos de vitamina D exógenos. Em contraste, durante períodos de stresse fisiológico, como na febre do leite (hipocalcemia), a  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  aumenta devido à sua regulação normal através da PTH. O metabolismo da  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  induzido por ela própria é, em parte, prevenido pela PTH (Reinhardt & Horst, 1989). À medida que a concentração de Ca aumenta, a secreção de PTH diminui e a  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  induz o seu próprio metabolismo. O aumento do metabolismo desta vitamina nas células alvo, em associação com a diminuição da sua produção leva ao término da resposta biológica (Horst *et al.*, 1994). A conclusão de que a PTH desempenha um papel importante na regulação dos RCVD é suportada por Jurutka *et al.* (1993), que dizem que o mecanismo de acção da PTH passa, primariamente, pela activação da proteína kinase A; descobriu-se também que esta proteína provoca a fosforilação dos RCVD e que essa fosforilação resulta na atenuação da actividade transcricional induzida pela  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  *in vitro*. A activação da proteína kinase A pela infusão de PTH bloqueia a expressão renal da Hidroxilase-24, sugerindo que a aquela proteína é um potente regulador da função dos RCVD *in vivo*.

### **3.2.2 Efeito da idade nos receptores celulares da vitamina D**

Durante a primeira lactação as vacas quase nunca desenvolvem febre do leite, apesar de poderem sofrer algum grau de hipocalcemia durante os primeiros dias de lactação; o intestino e o tecido ósseo adaptam-se muito rapidamente às exigências de cálcio durante este período. À medida que a idade da vaca aumenta, o processo de adaptação fica mais lento, resultando numa hipocalcemia moderada a severa no pós-parto. A absorção de Ca no intestino diminui com a idade nos bovinos (Handsard *et al.*, 1954). Estudos em ratos também indicam que as cobaias mais velhas têm menor capacidade de aumentar a eficiência de absorção em resposta a um stresse de Ca na dieta (Horst *et al.*, 1978). Outros autores também demonstraram que o número de RCVD no intestino diminui com a idade, tanto em ratos como em vacas. Assim, as vacas mais velhas têm menor capacidade de responder à  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  do que as vacas mais novas e levam mais tempo a adaptar os mecanismos intestinais de absorção de Ca para atingir as necessidades durante a lactação,

o que explica, em parte, porque razão na primeira lactação as vacas raramente desenvolvem febre do leite (Horst *et al.*, 1990).

Os osteoblastos são o único tipo de células ósseas que apresentam receptores para a vitamina  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ . Estudos laboratoriais demonstraram que osso de ratos velhos tinha menos receptores para esta vitamina do que o osso de ratos jovens (Horst *et al.*, 1990). O número de osteoblastos diminui com a idade, o que, sem dúvida, vai contribuindo para a perda de receptores à medida que esta avança (Malluche & Faugere, 1986) e contribui também para a remodelação óssea, resultando uma superfície óssea com menor área sujeita a reabsorção pelos osteoclastos. Assim, com a idade passa a existir menor número de osteoclastos para responder à estimulação pela PTH ou pela  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  e também para responder aos sinais de reabsorção emitidos pelos próprios osteoblastos, o que atrasa a capacidade de o osso contribuir para o *pool* plasmático de Ca (Horst *et al.*, 1994).

### 3.2.3 Efeitos da gravidez e lactação nos RCVD

A eficiência da absorção intestinal de Ca aumenta durante a gravidez e a lactação (Halloran & DeLuca, 1980). Na maioria das espécies a gravidez e a lactação são acompanhadas por um aumento plasmático da concentração de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  para estimular o aumento da absorção intestinal de Ca e também pelo aumento do número de receptores intestinais para a vitamina D (Goff *et al.*, 1988).

**Quadro 13: Número de receptores da vitamina D não ocupados no tecido intestinal de ratos e vacas em vários estados fisiológicos (Horst *et al.*, 1994)**

Estados fisiológicos	Rato		Vaca	
	X	SE	X	SE
Não gestante, não lactante	343	57	19	8
Prenhe	610	30	54	13
Lactante	645	32	76	11

X – Média; SE – Erro padrão.

### 3.5. Absorção intestinal de cálcio

O cálcio pode ser absorvido através do lúmen do intestino por difusão passiva por entre as células epiteliais intestinais (transporte paracelular) e por transporte activo através do epitélio celular (Bronner, 1987). O transporte paracelular de Ca está estritamente relacionado com a concentração de iões de Ca no lúmen do intestino. Quando a concentração de iões é superior a 6 mM, a equação de Nernst prevê um fluxo de Ca para o fluido intracelular. Estudos experimentais sugerem que, se os animais são alimentados com

uma dieta com alta concentração de Ca, mais de 50% deste elemento é absorvido pela via paracelular (Nellans, 1988). Uma eficiente absorção de Ca quando a sua concentração na dieta é baixa ou quando as necessidades são altas ocorre por transporte activo através das células epiteliais intestinais. Este processo necessita da vitamina  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ . A concentração de cálcio no intestino cerca de 1000 vezes superior à concentração deste elemento nas células epiteliais, pelo que a sua entrada nas células ocorre prontamente, entrada essa que é facilitada pela vitamina  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ . Contudo, este não parece ser o único passo necessário para que esta entrada ocorra, já que tem que atravessar a célula para o lado basolateral. Este passo é facilitado pela proteína que se liga ao Ca existente no citoplasma e está dependente da vitamina D. Numerosos estudos sugerem que a taxa de transporte de Ca transcelular está directamente relacionada com a quantidade desta proteína nas células (Pansu *et al.*, 1983). Uma vez transportado através da membrana basolateral, o cálcio é extrudido da célula contra o gradiente de concentração por bombas de Ca dependentes da ATPase-Ca-Mg (Wasserman *et al.*, 1984). Estas bombas funcionam dentro das células a uma velocidade muito inferior à sua capacidade máxima, estando assim preparadas para extrudir todo o Ca presente na membrana basal mesmo na ausência de vitamina D (Schiffel & Binswager, 1980).

#### **4. Tratamento da febre do leite**

As primeiras tentativas de tratamento da febre do leite remontam ao século XVIII. Mais tarde, por volta de 1806, o tratamento recomendado baseava-se no uso de botijas de água quente e de cobertores para fazer as vacas afectadas suar. Em 1814 o tratamento recomendado já era o sangramento pré-parto de 4 a 5 litros por dia durante 8 dias, sendo ainda proposto colocar água fria na cabeça ou esfregar as pernas da vaca com álcool.

O primeiro tratamento com sucesso da febre do leite foi proposto por Schidt, em 1897, que sugeriu que esta doença era causada por uma infecção viral presente no úbere das vacas. Para a tratar sugeriu que se injectasse iodeto de potássio nas tetas, tendo este tratamento reduzido a mortalidade em cerca de 60 a 70%. Mais tarde, Marshak percebeu que esta técnica de insuflação do úbere prevenia a formação de leite e consequentemente a perda de Ca do *pool* plasmático para a glândula mamária (Hibbs, 1950).

Em 1925, Littke e Wright fizeram uma descoberta bastante importante ao verificarem que as concentrações de Ca no plasma eram bastante baixas em vacas que sofriam de febre do leite. Com base nestas observações foi posteriormente proposta a administração endovenosa de borogluconato de Ca. A infusão endovenosa deste produto com uma concentração de 23% é o tratamento mais utilizado nos dias de hoje. Contudo, esta administração endovenosa não está isenta de riscos, pois altas concentrações de Ca ( $>25$

mg/dL) podem ocorrer se este for administrado num período de tempo bastante curto, provocando uma paragem cardíaca (Horst *et al.*, 1997).

Tratamentos de Ca endovenoso (usualmente 8 a 10 g de Ca) são usados para manter a vaca viva o tempo suficiente para que os mecanismos de compensação que ocorrem no intestino e nos ossos tenham tempo de se adaptar às novas necessidades.

## **5. Medidas de prevenção**

### **5.1. Vitamina D e seus metabolitos**

No início de 1900, alguns cientistas mostraram que a vitamina D era importante na absorção de Ca através do intestino (Steenbook & Black, 1924). Um dos primeiros relatórios publicados sugere a administração de grandes quantidades de vitamina D<sub>2</sub> durante umas semanas antes do parto (Hibbs & Pounden, 1955). Na altura, o mecanismo de acção proposto sugeria que a vitamina D actuava directamente nos tecidos-alvo (o osso e o intestino) para aumentar o movimento de Ca destas áreas para o plasma sanguíneo. Contudo, sabe-se hoje em dia que o mecanismo de acção está associado à produção da forma activa da vitamina D (Horst & Reinhardt, 1983). Em 1968, Blunt *et al.* descobriram um metabolito da vitamina D mais activo do que a própria vitamina D, tendo esta forma de vitamina D sido identificada como 25 - hidroxivitamina D<sub>3</sub>, que se pensou ser a forma activa da vitamina D. Hoje sabe-se que a forma activa é a [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], que é produzida no rim pela enzima 1 $\alpha$  hidroxilase (Reinhardt *et al.*, 1981). Assim, a descoberta da [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] gerou um interesse muito grande como prevenção da febre do leite (Hove & Kristiasen, 1984). Um problema potencial do uso de vitamina D e dos seus metabolitos é o efeito inibitório da enzima 1 $\alpha$  hidroxilase renal.

Em estudos realizados por Littledike e Horst (1982), muitas vacas tratadas com compostos de vitamina D ou com os seus metabolitos mostraram sinais de hipocalcemia e sinais clínicos de febre do leite entre 10 a 14 dias após o parto. Os mesmos investigadores demonstraram que as vacas tratadas com compostos de vitamina D não eram capazes de produzir a [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] endógena e, conseqüentemente, eram também incapazes de recuperar da hipocalcemia.

## 5.2. Gel de cálcio

A administração oral de grandes quantidades de sal de cálcio força a entrada de Ca no sangue por difusão passiva, aumentando assim a concentração do Ca plasmático durante o período periparto.

O sal tradicionalmente usado tem sido o  $\text{CaCl}_2$  (Hallgren, 1965). Nos estudos realizados o  $\text{CaCl}_2$  era administrado por via oral durante vários dias antes do parto até 1 a 2 dias após este. Tratava-se de um tratamento bastante efectivo na redução da incidência da febre do leite. Mais recentemente uma pasta comercial de  $\text{CaCl}_2$ , em que cada tubo contém cerca de 54 g de Ca, era administrada na altura do parto e às 12h e 24h após este, reduzindo a incidência da febre do leite e do deslocamento do abomaso (Oetzel, 1993).

Os géis de Ca têm várias desvantagens. Como as suas soluções aquosas são muito cáusticas, causam ulceração da boca e da mucosa digestiva das vacas (Wermuth, 1990), para além de reduzirem o pH sanguíneo, como fazem todos os produtos de  $\text{CaCl}_2$ . Até um certo grau esta alteração é benéfica, porque aumenta a sensibilidade dos tecidos à PTH (Goff *et al.*, 1991). Contudo, a administração excessiva de  $\text{CaCl}_2$  pode induzir uma acidose metabólica (Goff & Horst, 1994) que pode causar inapetência numa altura em que a ingestão de alimento está comprometida.

## 5.3. Paratormona

Em 1925 foi sugerido por Dryerre & Greig que a hipocalcemia da febre do leite resultava de uma produção insuficiente de PTH. Estudos posteriores vieram mostrar que a secreção de PTH, em resposta à hipocalcemia em vacas que se apresentavam com febre do leite, era igual ou superior à das vacas que não eram portadoras desta doença (Capen & Young, 1967). Marting e Mayer (1975) observaram que as vacas em pré-parto respondiam positivamente à administração exógena de PTH, contudo, essa resposta era inferior à das vacas em pós-parto.

Depois de estas descobertas terem sido realizadas, houve avanços significativos na investigação com vista a produzir grandes quantidades de PTH. Goff reavaliou o uso de PTH na prevenção da febre do leite e verificou que, tanto esta doença como a hipocalcemia subclínica, podiam ser prevenidas com a administração de infusões de PTH ou de injeções (Goff *et al.*, 1989). Goff *et al.* (1986) concluíram ainda que o desenvolvimento de um implante capaz de libertar periodicamente pequenas quantidades de PTH poderá ser um método prático e eficiente de prevenção.

## 5.4. Estratégias dietéticas

### 5.4.1. Balanço de cátions-aniões na dieta

Uma das mais significativas, mas menos compreendidas, descobertas quanto à utilização de dietas modificadas para controlar a febre do leite foi que a introdução de ácidos inorgânicos (mistura de ácido sulfúrico e clorídrico) na dieta de vacas no pré-parto reduzia significativamente a incidência de febre do leite (Ender *et al.*, 1971). Estes autores propuseram que a incidência da febre do leite dependia da maior abundância de cátions  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  relativamente aos aniões  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ . Este conceito é conhecido como diferença de catião-anião (DCA) e é expresso segundo a seguinte equação:  $\text{DCA (meq/kg)} = (\text{meq Na}^+ / \text{kg} + \text{meq K}^+ / \text{kg}) - (\text{meq Cl}^- / \text{kg} + \text{meq SO}_4^{2-} / \text{kg})$  (EQ 1). Subsequentemente, várias publicações validaram o conceito DCA e demonstraram a utilidade da adição de aniões às dietas das vacas em pré-parto como forma de prevenir a febre do leite. Várias investigações sugeriram que a introdução na dieta de valores de DCA entre -50 meq/kg a -100 meq/kg seria uma óptima opção para prevenir a doença (Gaynor *et al.*, 1989).

O conceito DCA é baseado na teoria de uma diferença iónica forte que sugere que o influxo de qualquer catião mineral para o organismo resulta numa alteração do estado ácido-base do animal. A extensão desta alteração depende da quantidade de iões que entram no organismo e, assim, a diferença entre o número de cátions e de aniões disponíveis para absorção na dieta determina o estado ácido-base da vaca. As vacas tornam-se acidóticas se predominar a absorção de aniões e alcalóticas se predominar a absorção de cátions. A adição de sais aniónicos às dietas resulta numa diminuição do pH do sangue e da urina e está associada à redução da incidência da febre do leite (Gaynor *et al.*, 1989); por sua vez, a adição de Na ou K às dietas aumenta o pH do sangue e da urina e está associada ao aumento da incidência de febre do leite (Goff & Horst, 1997). Um método útil para determinar se uma vaca está a responder à adição de aniões na dieta é através da monitorização do pH urinário. Se este se encontrar entre 5,5 e 6,2 a administração de aniões está a ser efectiva; se for inferior a 5,5 a dieta aniónica deve ser reduzida para evitar uma acidose metabólica severa (Horst *et al.*, 1997). O mecanismo exacto de como as dietas aniónicas funcionam não é ainda muito bem compreendido, contudo, alguns trabalhos na área sugerem que, induzindo uma acidose metabólica ligeira pela adição de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  através da dieta às vacas no pré-parto aumenta a resposta dos tecidos à PTH (Goff *et al.*, 1991). Esta conclusão foi baseada em observação de que quando se adicionam aniões à dieta, aumenta a reabsorção osteoclástica óssea e a síntese de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  nas vacas. Ambos os processos fisiológicos são controlados pela PTH. Sabe-se que a síntese de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  aumenta nas vacas que ingerem dietas acidificadas (Abu Damir *et al.*, 1994). A concentração plasmática de PTH é tão alta nas vacas que tiveram um recaída da

febre do leite como nas que não tiveram recaída alguma. Como a PTH deve estimular a produção renal de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ , este facto sugere que os rins de vacas com febre do leite se encontram temporariamente refractários à estimulação pela PTH. Indirectamente, isto sustenta a hipótese de que os receptores para a PTH, proteínas na superfície dos ossos e das células renais responsáveis por reconhecer esta hormona, não funcionem tão bem com um pH sanguíneo elevado. Sem um receptor funcional a PTH não é capaz de exercer a sua função nos tecidos e a homeostasia do Ca fica comprometida. Os estudos que sustentam esta hipótese foram efectuados em ratos e cães, tendo sido testada a resposta dos tecidos à PTH; foi mostrado que o osso e o rim eram refractários à administração exógena desta hormona em condições de alcalinidade sanguínea e que os efeitos da hormona aumentavam na acidose metabólica (Beck & Webster, 1976). Isto sugere que a maior causa subjacente da febre do leite é a alcalose metabólica, que provoca uma incapacidade de o osso e o rim da vaca responderem à estimulação pela PTH. Esta fraca resposta, por sua vez, reduz a capacidade de a vaca mobilizar o Ca ósseo e a produção de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  necessária para o transporte de Ca através do intestino (Beck & Webster, 1976).

As dietas com baixo DCA previnem a alcalose metabólica aumentando a resposta dos tecidos à PTH, a qual controla a  $1\alpha$  hidroxilase e a reabsorção óssea do Ca. O aumento da capacidade de resposta permite que a vaca se adapte com sucesso ao stresse associado ao início da lactação.

A equação da DCA é um pouco limitada porque ignora a contribuição de outros catiões e aniões, como o  $\text{Ca}^{2+}$ , o  $\text{Mg}^{2+}$  e o  $\text{PO}_4^{3-}$ . A equação também assume que a potência de acidificação do  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  na dieta é igual. Contudo, o  $\text{Cl}^-$  é um acidificante mais potente do que o  $\text{SO}_4^{2-}$  (Tucker *et al.*, 1991).

Uma equação alternativa à apresentada anteriormente tem em conta a disponibilidade de alguns iões mais importantes, e traduz-se por  $\text{DCA (meq/kg)} = (0,38 \text{ meq Ca}^{2+}/\text{kg} + 0,3 \text{ meq Mg}^{2+}/\text{kg} + \text{meq Na}^+/\text{kg} + \text{meq K}^+/\text{kg}) - (\text{meq Cl}^-/\text{kg} + 0,6 \text{ meq SO}_4^{2-}/\text{kg})$  (EQ 2), onde se considera que o  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  são absorvidos com eficácia de 100% (Tucker *et al.*, 1991).

#### 5.4.2. Manipulação do estado ácido-base

A prevenção da febre do leite requer que o pH do sangue seja reduzido para prevenir a alcalose metabólica. Utilizando a última equação, este pode ser reduzido pela adição de aniões à dieta ou através da redução do número de catiões. As fontes mais comuns de aniões incluem o  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  sais de Ca, amónio e Mg. Os sais de fosfato não são muito utilizados porque têm um fraco poder de acidificação. O fosfato é absorvido com um pouco mais de eficiência do que o catião correspondente. As altas concentrações de fosfato

também podem deprimir a síntese renal de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ , resultando em febre do leite (Kichura *et al.*, 1982).

#### **5.4.3. Remoção dos cátions da dieta**

A adição de aniões à dieta para reduzir a DCA tem limitações devido aos problemas de palatabilidade das fontes dos sais aniônicos frequentemente usados (Oetzel & Barmore, 1993). Se numa dada dieta a DCA for superior a 250 meq/kg será muito difícil adicionar sais aniônicos na quantidade necessária para fazer a baixar para os níveis recomendados de - 100 meq/kg sem causar problemas de palatabilidade. Contudo, o pH também pode ser reduzido através da remoção de cátions da dieta, mas é necessário ter o cuidado para que essa redução não seja feita abaixo das necessidades diárias da vaca, particularmente o Na e o Mg, que podem representar percentagens baixas na composição de determinados alimentos (National Research Council, 1989).

Em vacas alimentadas com dietas pobres em Na ou em K a incidência da febre do leite é menor do que nas que são alimentadas com dietas ricas nestes dois elementos. Este estudo demonstrou a utilidade em reduzir a quantidade de cátions para prevenir a febre do leite em vez de se aumentar apenas a quantidade de aniões. O cátion presente na maioria dos alimentos para ruminantes é o K, sendo a sua introdução feita na alimentação através das forragens (Goff & Horst, 1997).

#### **5.4.4 Dieta pobre em Ca**

O cálcio é um cátion muito forte. Segundo a EQ 2, a adição de Ca à dieta faz aumentar o pH e predispõe as vacas ao desenvolvimento da febre do leite. Tanto alguns estudos prospectivos como outros retrospectivos têm concluído que as dietas ricas em Ca, administradas no pré-parto, estavam associadas ao aumento da incidência desta doença (Beitz *et al.*, 1974). Contudo, também existe evidência de que as dietas ricas em Ca não só não causam a doença como ajudam a preveni-la (Green *et al.*, 1981), especialmente se lhes forem adicionados aniões (Beede *et al.*, 1991).

Os estudos prospectivos que indicam que as dietas ricas em Ca aumentam o risco de febre do leite envolveram vacas em pré-parto, alimentadas com dietas pobres neste macroelemento. Estas vacas, alimentadas com estas dietas pobres em Ca antes do parto (entre 10 a 20 g de Ca/dia), não têm as quantidades necessárias para a manutenção ou para o desenvolvimento do esqueleto do feto, cujas necessidades se situam em torno de valores aproximados de 30 g/dia. Como resultado disto, apresentam um balanço de Ca negativo que resulta na estimulação da PTH e na produção de  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  antes do



nascimento (Green *et al.*, 1981). Este processo também activa a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a reabsorção de Ca pelos rins. Assim, no começo da lactação, os mecanismos homeostáticos do Ca estão activos prevenindo o declínio severo da concentração de Ca no plasma da vaca (Goings *et al.*, 1974). Um estudo realizado mostrou que para que este mecanismo se estabeleça os níveis de Ca na dieta têm de ser reduzidos para valores inferiores a 20 g/dia (Green *et al.*, 1981). Quando o  $\text{CaCO}_3$  foi adicionado a dietas pobres em Ca para aumentar os valores para números entre os 80 e 120 g de Ca/dia, que ficam bastante acima do necessário, a incidência da febre do leite aumentou. Com base nestes estudos experimentais foi recomendado que, por rotina, a quantidade de Ca presente na dieta antes do parto deva ser mantida em níveis baixos. Contudo, as dietas podem conter até 50 g de Ca/dia (Jorgensen, 1974). Para conseguir uma dieta com quantidades de Ca inferiores a 50 g por dia, forragens como a luzerna devem ser retiradas e substituídas por outras como a silagem de milho.

## **6. O papel da Vitamina D na reprodução**

A informação dos efeitos específicos da vitamina D na função reprodutiva é limitada. As vacas alimentadas com luzerna, sob condições de confinamento e sem suplementação de vitamina D, apresentam uma incidência de vitelos com fraqueza muscular comparativamente às que receberam esses suplementos de vitamina D e tiveram uma exposição ao sol (Horst & Reinhardt, 1983). A suplementação com vitamina D também influencia o tempo até ao estro e o intervalo entre os partos (Ward *et al.*, 1971). Foram também verificadas relações específicas entre a vitamina D e o sistema reprodutivo e endócrino.

Algumas experiências, através de culturas *in vitro*, de células da glândula pituitária de ratos têm mostrado que pode haver estimulação com vista à síntese da prolactina através de 1,25 – dihidroxivitamina  $\text{D}_3$  (Wark & Tashjian, 1982).

### **6.1. Mecanismo de acção da vitamina D na reprodução**

A chave para perceber o mecanismo de acção da vitamina D é a interacção com os receptores intracelulares específicos (Marx *et al.*, 1983). A presença de receptores para a 1,25 Dihidroxivitamina  $\text{D}_3$ , o metabolito primário envolvido na homeostase do Ca, tem sido encontrada em vários tecidos reprodutivos, incluindo o ovário, o útero, a placenta, os testículos e a pituitária (Levy *et al.*, 1984). Pensa-se que a vitamina D funciona como um regulador intracelular do Ca, contudo, deve ter outros mecanismos de acção (Norman *et al.*, 1982). Outros metabolitos da vitamina D podem ter funções específicas nos tecidos reprodutivos. A placenta metaboliza o 25-hidroxi  $\text{D}_3$  para 1,25 – dihidroxy  $\text{D}_3$  e para 24,25 –

dihidroxy D<sub>3</sub> (Norman *et al.*, 1982). Por sua vez, receptores específicos para o último metabolito têm sido identificados em vários tecidos esqueléticos mas não em tecidos reprodutivos (Norman *et al.*, 1982).

## **7. Cálcio e fósforo na função reprodutiva**

A diminuição da concentração de cálcio sanguíneo pode aumentar a incidência de distócia, de retenção placentária e de prolapso uterino e ainda atrasar a involução uterina (Morrow, 1980), podendo estes efeitos surgirem como efeitos secundários a uma hipocalcemia. O excesso de cálcio pode diminuir a função reprodutiva devido a uma deficiência de P, Mg, Zn, Cu e outros microelementos, pelo facto de inibir a absorção dos mesmos pelo intestino. Alguns mecanismos dependentes do cálcio estão envolvidos na biossíntese de esteróides nos testículos, na glândula adrenal e nos ovários (Veldhuis & Klase, 1982).

Os rácios de Ca:P na dieta podem estar alterados através do consumo de vitamina D (Pugh *et al.*, 1985). O fósforo está muitas vezes associado a alterações reprodutivas nas vacas, sobretudo à infertilidade devido à sua deficiência e, geralmente, manifesta-se depois de outros sinais desta deficiência serem aparentes (Pugh *et al.*, 1985). As manifestações clássicas de deficiência de P na reprodução envolvem alterações no estro (Maynard *et al.*, 1979), na indução de uma baixa taxa de concepção, em cios irregulares, no anestro, na diminuição da actividade ovárica e no aumento da incidência de quistos foliculares (Maynard *et al.*, 1979). O estado hipofosfatémico afecta quase todo o tipo de células porque o P é um componente integral dos ácidos nucleicos, nucleótidos, fosfolípidos e em algumas proteínas, sendo ainda necessário para a transferência e utilização de energia e para o metabolismo normal dos fosfolípidos (Maynard *et al.*, 1979).

## **Parte III - Estudo da hipocalcemia subclínica e do seu impacto numa exploração leiteira**

### **1. Impacto da hipocalcemia numa exploração leiteira**

A febre do leite é uma doença economicamente importante numa exploração leiteira e pode reduzir a vida produtiva de uma vaca em cerca de 3 ou 4 anos (Payne, 1968). Em 1997 o custo médio por cada caso de febre do leite foi estimado em cerca de 333USD, sendo este valor apurado com base no custo do tratamento clínico e nas perdas de produção de leite.

As vacas que sofreram esta doença ficam também susceptíveis a problemas secundários que aumentam ainda mais os custos de produção. Por exemplo, foi demonstrado que as vacas que recuperam da febre do leite têm uma incidência de cetose e de mastites cerca de 8 vezes superior às vacas que nunca tiveram a doença. Também a incidência de distócia, de retenção placentária, de deslocamento do abomaso e de prolapso uterino é maior em resultado desta doença (Curtis *et al.*, 1983).

A hipocalcemia é uma das complicações mais comuns no pós-parto das vacas leiteiras. Como já referimos anteriormente na revisão bibliográfica, ocorre quando a concentração de cálcio no sangue é inferior a 8 mg/dl, embora os sinais clínicos só se verifiquem quando essa concentração é inferior a 5 mg/dl.

A ocorrência de hipocalcemia nas vacas leiteiras predispõe-nas a contraírem várias doenças características do pós-parto. Assim, a hipocalcemia provoca um aumento da disfunção do sistema imunitário e uma diminuição da musculatura lisa e esquelética, podendo daí resultar as seguintes consequências:

- a diminuição da motilidade uterina, aumentando a probabilidade da ocorrência de distocia, de retenção placentária e de metrite;
- a diminuição da contracção do canal do teto, tornando-o mais vulnerável à ascensão de agentes patogénicos após a ordenha, o que pode provocar mamites (Mulligan *et al.*, 2006).

Para além das complicações acima referidas, segundo Sheldon (2008), a hipocalcemia tem uma influência negativa directa na fertilidade por estar associada à inactividade do ovário, aumentando assim o número de serviços de inseminação artificial (IA) por concepção, o intervalo entre o parto e o primeiro serviço e provocando ainda um aumento do intervalo entre o parto e a concepção seguinte. Também se verifica uma influência negativa indirecta na fertilidade devido a aumento do número de distocias, de retenção placentária e de endometrites.

Mas as consequências da hipocalcemia não se ficam por aqui, tendo o prolapso uterino sido também associado à hipocalcemia, tanto a clínica como a subclínica (Mulligan *et al.*, 2006) e ainda à afecção do sistema digestivo. Associada à diminuição da motilidade do

rúmen e do abomaso há a diminuição da ingestão de alimentos, que acentua o balanço energético negativo pós-parto, predispondo assim à cetose. A diminuição da motilidade gastro-intestinal (GI) origina uma atonia ruminal e, conseqüentemente, a deslocação do abomaso.

A cetose clínica e subclínica é uma causa importante de prejuízos para os produtores de leite. Raramente é irreversível e as perdas resultam principalmente da diminuição da produção de leite durante a cetose e após a recuperação, apesar de, em casos severos, poder levar à perda do animal. Tanto a cetose clínica como a subclínica são acompanhadas por uma quebra na produção de leite e nas quantidades de proteína e de lactose deste. Em consequência da cetose ocorre também um atraso no retorno à ciclicidade, taxas de concepção mais baixas e ainda um aumento do risco de quistos nos ovários e mamites (Radostitis *et al.*, 2000).

## **2. Incidência da hipocalcemia severa e hipocalcemia subclínica**

Apesar da atenção ao manejo nutricional da hipocalcemia ser de extrema importância, não nos podemos esquecer de que nem todos os riscos associados a esta doença resultam da formulação da ração. Um dos mais objectivos sinais da possibilidade de um animal estar a sofrer de hipocalcemia passa pelo seu decúbito. Este é muitas vezes causado por esta patologia, mas outras causas significativas podem incluir a hipomagnesiemia, as lesões músculo-esqueléticas secundárias à hipocalcemia, a cetose associada ao parto, a hipofosfatemia e um número variável de outros problemas menos frequentes como as mastites e outras infecções. A distócia é também uma das maiores causas de decúbito peri-parto, tendo Chamberlain (1987) reportado que cerca de 46% de decúbitos em vacas eram devido a ela, 38% devido a hipocalcemia e 16% devido a outras causas.

A hipocalcemia clínica ou febre do leite ( $\text{Ca} < 5\text{mg/dl}$ ), assim como a hipocalcemia subclínica ( $\text{Ca } 5,1 - 7,9 \text{ mg/dl}$ ) são factores de risco para muitas doenças importantes da lactação como a mastite, a cetose, a retenção placentária, o deslocamento do abomaso e o prolapso uterino. A hipocalcemia é também um factor de risco nos problemas reprodutivos e um factor indirecto para o aumento das perdas relacionadas com mortes e abates no efectivo (Erb *et al.*, 1985).

## **3. Ensaio clínico em vacas leiteiras**

Este ensaio clínico efectuado em vacas leiteiras foi baseado num número de animais suficiente para que pudesse ter um resultado significativo e válido.

Os estudos de rebanho são úteis quando um número suficiente de vacas é testado num rebanho. Isto dá uma confiança razoável de que os resultados (quer em proporção, quer

em média) representem verdadeiramente a população ou um número de vacas elegíveis dentro desse rebanho. Os clínicos não necessitam de testar tantas vacas como os investigadores para obter 95% de confiança nos resultados.

Os intervalos de confiança baixos são inerentes às decisões de rebanho. Quando o objectivo é resolver problemas metabólicos do rebanho não há outra opção senão tomar decisões. Os clínicos têm que tomar constantemente decisões baseadas não só em informações limitadas, mas, sobretudo, num número muito limitado de amostras e num intervalo de tempo reduzido.

O tamanho mínimo de uma amostra para testes de rebanho com resultados proporcionais é de 12 vacas. Este número mínimo dá, no entanto, uma confiança razoável (75% ou mais) de que os resultados dos testes nessas vacas representem a verdadeira classificação do grupo inteiro (Oetzel, 2004).

### **3.1 Colheita das amostras**

Na colheita das amostras biológicas foi posto o maior cuidado possível para que os valores não pudessem ser influenciados por factores externos.

A colheita de sangue foi efectuada no terço superior da veia jugular, após uma assepsia da zona, na quantidade de 5 ml e com uma seringa de 10 ml e uma agulha de 18G. Após a colheita o sangue foi colocado em tubos heparinizados e identificados correctamente. As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos e o plasma foi congelado imediatamente a uma temperatura de -15 °C.

Para a realização deste estudo sobre a hipocalcemia subclínica na vaca leiteira escolheram-se aleatoriamente 12 animais que já tivessem parido pelo menos uma vez. Esta escolha foi realizada no decurso da prática clínica, pois as vacas não parem todas no mesmo dia. Assim, tentou-se escolher animais aparentemente saudáveis antes do parto, sem sinais evidentes de doença e que não tivessem qualquer história de doença nos anos anteriores.

Para validar a escolha foi realizado um exame físico prévio que nos confirmasse que no momento antes do parto a vaca não apresentava sinais evidentes de doença.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- O apetite;
- A temperatura;
- O estado de hidratação;
- O número de contracções ruminais;
- A auscultação cardíaca e respiratória.

Devo referir que todas as vacas submetidas a medições de níveis de cálcio após o parto apresentavam os parâmetros dentro dos valores de referência para o estado fisiológico correspondente.

### 3.2. Método de análise

As concentrações de cálcio foram determinadas por um método de espectrofotometria de absorção num laboratório nacional de referência recorrendo a um espectrómetro de absorção atômica. A concentração de fósforo foi determinada pelo método automatizado (Autoanalyzer, EUA) utilizando a técnica Análise de fluxo contínuo (AFC).

### 3.3. Resultados obtidos

O Quadro 14 demonstra os valores de cálcio e fósforo sanguíneos obtidos após o parto em vacas leiteiras da Herdade dos Salgados. O Valor de referência para o Ca é 8,0-12,4 mg/dl enquanto que o valor de referência para o P é 4,30-7,80 mg/dl.

**Quadro 14: Valores séricos de cálcio e fósforo**

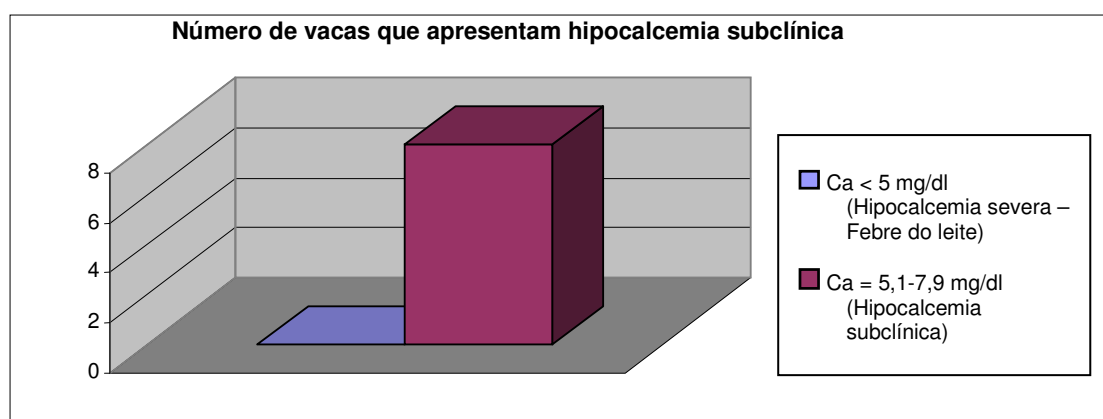
<b>Número da vaca</b>	<b>Ca (mg/dl)</b>	<b>P (mg/dl)</b>
946	9,77	5,54
1384	10,10	4,85
1395	9,41	5,8
8834	8,16	7,19
<b>998</b>	<b>7,09</b>	<b>6,43</b>
<b>1211</b>	<b>6,66</b>	<b>4,77</b>
<b>1260</b>	<b>7,82</b>	<b>5,68</b>
<b>1328</b>	<b>7,40</b>	<b>8,08</b>
<b>1345</b>	<b>6,77</b>	<b>5,59</b>
<b>1405</b>	<b>7,01</b>	<b>7,97</b>
<b>8694</b>	<b>7,51</b>	<b>4,30</b>
<b>8841</b>	<b>6,70</b>	<b>4,06</b>

A análise dos valores apresentados no quadro permite perceber que 8 das vacas submetidas ao estudo apresentam concentrações de cálcio inferiores a 8,0 mg/dL, podendo dizer-se que estavam num estado metabólico de hipocalcemia.

Estas oito vacas correspondem a mais de metade no número que constituiu a amostra estudada, apresentando uma frequência relativa de 66,6%, o que é um valor bastante elevado se transpusermos esta percentagem para o efectivo total de uma exploração leiteira.

Após o tratamento dos dados verificou-se que o número de vacas que apresentaram hipocalcemia correspondia àquelas que tinham valores de cálcio entre 5,1e 7,9 mg/dl, valores que se consideram corresponderem à hipocalcemia subclínica, como se mostra na Figura 4.

**Figura 4. Número de vacas com valores de cálcio compreendidos entre 5,1-7,5 mg/dl, correspondendo a hipocalcemia subclínica**



Como foi referido anteriormente, a hipocalcemia tanto pode afectar de forma directa como indirecta as eficiências reprodutiva, digestiva e metabólica.

Assim, para se tentar perceber se a hipocalcemia subclínica tem impacto numa exploração leiteira estabeleceu-se uma comparação entre as vacas que apresentaram a doença e as que não a apresentavam, tendo em conta a produção leiteira, os problemas reprodutivos e os problemas digestivos e metabólicos.

### **3.3.1. Produção de leite**

Como se sabe, uma vaca leiteira de alta produção produz cerca de 10000 litros de leite durante um período de 305 dias. A curva de lactação indica-nos que o máximo de produção é atingido cerca do dia 100 após o parto, com um valor médio aproximado de 3650 L no fim desse período, isto a partir da 2.<sup>a</sup> lactação.

O Quadro 15 mostra-nos a quantidade de leite produzido pelas vacas submetidas ao estudo.

**Quadro 15: Produção leiteira em litros das vacas submetidas a medições dos níveis de Ca e P**

<b>Número da vaca</b>	<b>Leite (L) 1.ª Lact. –100d</b>	<b>Leite (L) 2.ª Lact. –100d</b>	<b>Leite (L) 3.ª Lact. –100d</b>	<b>Leite (L) 4.ª Lact. –100d</b>	<b>Leite (L) 5.ª Lact. –100d</b>
946	2990	5521	4910	2253 (M)	
1384	2979	3945			
1395	3355	2257 (M)			
8834	3206	3763			
<b>998</b>	3107	4064	4182	3635 (M)	
<b>1211</b>	3293	4272	3676 (M)		
<b>1260</b>	2285	2577	4001		
<b>1328</b>	3802	5002			
<b>1345</b>	1955	3289			
<b>1405</b>	1399	2506			
<b>8694</b>			1279 (M)	4377	4086
<b>8841</b>	3212	4164			

M – Mastite;

Os números assinalados a negrito referem-se às vacas que apresentaram valores que indicam terem hipocalcemia subclínica. A lactação avaliada no estudo foi sempre a última, embora diferente o seu número de ordem de vaca para vaca.

Podemos verificar que a quantidade de litros de leite produzida pelas vacas que apresentam hipocalcemia subclínica é semelhante à das vacas que apresentam níveis de cálcio dentro dos valores fisiológicos de referência.

Um dos problemas secundários da hipocalcemia é o aparecimento de mastite (M), patologia presente em 5 vacas das 12 que foram alvo do estudo, como podemos verificar no Quadro 15. Destas 5, 3 apresentam valores de hipocalcemia subclínica, como verificámos no Quadro 14, o que nos permite questionar se o desenvolvimento da mastite nestes casos está directamente relacionado com a presença desta patologia, pois sabemos que ela tem origem multifactorial.

### **3.3.2. Problemas reprodutivos**

Como já foi referido anteriormente, os principais problemas reprodutivos associados à hipocalcemia são o prolapso uterino, a endometrite, a retenção placentária, a realização de parto assistido e o aumento do intervalo entre o parto e a concepção (IPC).

O Quadro 16 mostra a data do parto, a data da primeira e das restantes inseminações artificiais (IA) e o tipo de parto.



Podemos verificar que do grupo das 12 vacas seleccionadas para a realização do estudo 4, entre as 8 que apresentaram valores de hipocalcemia subclínica, necessitaram da realização de parto assistido (são elas as números 1211, 8841, 8694 e 1405); no entanto, as vacas números 1345, 1260, 988 e 1328, que também sofriam de hipocalcemia subclínica, não manifestaram qualquer sinal de necessitar de auxílio no parto, tendo este corrido naturalmente. Neste quadro podemos ainda verificar que o número médio de serviços por vaca estudada é de cerca de duas e meia (2,5), sendo o máximo seis e o mínimo uma. A média total de inseminações no rebanho geral é por sua vez, também, de cerca de duas e meia (2,5), o que nos mostra que as vacas que apresentaram hipocalcemia subclínica estão ainda dentro do padrão.

Em termos de gestação verificou-se que três animais ficaram gestantes com apenas um serviço e cinco com dois serviços, o que representa a moda desta amostragem de 12 bovinos.

Verificou-se também que houve vacas que necessitaram de mais de três serviços até à concepção, nomeadamente a número 1345, que necessitou de seis, e a número 1328, que necessitou de cinco.

No que aos animais com sinais de hipocalcemia diz respeito verificou-se que a moda se mantém no segundo serviço e que apenas houve alterações no número de animais gestantes com um serviço, tendo este diminuído em um valor.

**Quadro 16: Data do parto das vacas submetidas a medições de cálcio e da inseminação artificial (IA) após o parto**

<b>N.º da vaca</b>	<b>Data do parto</b>	<b>Tipo de parto</b>	<b>Data 1.ª insemin.</b>	<b>Data 2.ª insemin.</b>	<b>Data 3.ª insemin.</b>	<b>Data 4.ª insemin.</b>	<b>Data 5.ª insemin.</b>	<b>Data 6.ª insemin.</b>
946	16-08-2010	N	16-10-2010					
1384	14-08-2010	N	08-10-2010	02-11-2010				
1395	12-08-2010	N	22-10-2010					
8834	07-08-2010	N	18-09-2010	11-10-2010				
<b>998</b>	16-07-2010	N	17-09-2010	12-10-2010				
<b>1211</b>	04-09-2010	A	11-09-2010	09-11-2010	13-01-2011			
<b>1260</b>	23-07-2010	N	09-09-2010	08-02-2011				
<b>1328</b>	14-08-2010	N	13-10-2010	02-11-2010	19-11-2010	09-12-2010	29-01-2011	
<b>1345</b>	28-07-2010	N	27-09-2010	16-10-2010	09-11-2010	04-12-2010	23-12-2010	08-02-2011

<b>1405</b>	11-08- 2010	A	19-09- 2010	28-11- 2010	08-02- 2011			
<b>8694</b>	08-07- 2010	A	14-11- 2010					
<b>8841</b>	26-07- 2010	A	13-10- 2010	03-02- 2011				

**Quadro 16: (continuação)**

N – Parto normal; A – Parto assistido

O intervalo entre o parto e a concepção é um dos parâmetros mais utilizados para medir a eficiência reprodutiva de uma exploração leiteira. Este intervalo permite ao produtor intuir os problemas associados à saúde das vacas e tentar compreender o que se passa com as mesmas.

O Quadro 17 mostra-nos o número de dias necessários desde o parto até à concepção, permitindo ter uma melhor noção destes valores.

A análise apresentada no Quadro 17, que seguiu uma metodologia semelhante à que foi usada no quadro anterior, mostra-nos que o tempo médio entre o parto e a concepção foi de cerca de 130 dias, valor que se encontra dentro da média de referência nas vacas normais e abaixo da média geral do rebanho, que é de 143 dias.

**Quadro 17: Número de dias da 1.ª inseminação artificial após o parto e das restantes até à concepção**

<b>N.º da vaca</b>	<b>1.ª Insem. (n.º de dias após o parto)</b>	<b>2.ª Insem. (n.º de dias após o parto)</b>	<b>3.ª Insem. (n.º de dias após o parto)</b>	<b>4.ª Insem. (n.º de dias após o parto)</b>	<b>5.ª Insem. (n.º de dias após o parto)</b>	<b>6.ª Insem. (n.º de dias após o parto)</b>
946	61					
1384	55	80				
1395	71					
8834	42	65				
<b>998</b>	63	88				
<b>1211</b>	42	101	167			
<b>1260</b>	48	200				
<b>1328</b>	60	80	97	117	168	
<b>1345</b>	61	80	104	129	148	195
<b>1405</b>	39	109	181			
<b>8694</b>	130					
<b>8841</b>	79	192				

Também se teve em conta o número médio de dias desde o parto até ao primeiro serviço, que é cerca de 70 dias no rebanho, e que nas vacas isoladas para este estudo foi de cerca de 63 dias. O número de dias desde o parto ao primeiro serviço tem um intervalo entre os 60 e os 80 dias.

Os restantes problemas reprodutivos associados à hipocalcemia, referidos anteriormente, não foram tomados em linha de conta, pois nenhuma das vacas envolvidas no estudo os apresentou. Contudo, foi considerado o deslocamento do abomaso, mas, quer esta, quer outras doenças das acima referidas não foram apresentadas por nenhuma das vacas alvo do estudo.

## Conclusão

Após uma revisão bibliográfica sobre o tema da hipocalcemia na vaca leiteira, pude constatar que nos últimos 60 anos se tem procurado compreender as principais causas das alterações do metabolismo do cálcio nestes animais após o parto. As tentativas de compreensão destas causas têm visado descobrir a forma mais eficaz de se intervir para se evitar esta perturbação metabólica, de que resultam consequências bastante negativas para os produtores de leite.

Por ser uma temática , pretendi com a presente dissertação, escudada num trabalho de campo, dar mais um contributo no sentido dessa compreensão, tendo como pontos de partida os seguintes:

- uma breve revisão da anatomia e da fisiologia da glândula mamária, assim como do metabolismo do cálcio, para a melhor compreensão de aspectos importantes que possam ajudar ou vir a ter importância no tratamento da hipocalcemia nas vacas leiteiras. É feita também uma referência ao tratamento e às medidas de prevenção da hipocalcemia;
- uma análise do impacto nas explorações da existência desta doença e se os seus efeitos eram tão importantes como os da hipocalcemia severa.

A hipocalcemia da vaca leiteira fica a dever-se a um conjunto de factores que levam os mecanismos responsáveis pela homeostase do cálcio a nível plasmático (a saber: a absorção de cálcio no intestino e a sua reabsorção a partir dos ossos, principal reserva deste elemento no organismo) a não se adaptarem com a rapidez necessária às necessidades após o parto e o início da lactação.

Ao longo das últimas décadas houve tentativas para se providenciarem formas eficazes de combater esta doença metabólica, como diversos tratamentos, dando-se, no entanto, uma ênfase especial à prevenção. Os métodos mais utilizados hoje em dia consistem, essencialmente, nas formulações nutricionais adequadas à fase do ciclo em que as vacas se encontram, sendo o mais utilizado a diferença de catiões-aniões nas dietas. Apesar destas medidas preventivas, verifica-se ainda a existência de hipocalcemia subclínica nas explorações leiteiras.

Foi essa constatação que levou à realização deste ensaio clínico ao longo do estágio, que teve dois objectivos:

- demonstrar que a existência de hipocalcemia subclínica numa exploração leiteira é uma realidade;
- demonstrar que, através da associação do desempenho reprodutivo e produtivo das vacas submetidas ao ensaio com vacas em que havia a confirmação de serem portadoras de febre do leite, a hipocalcemia subclínica tem um impacto negativo na exploração de leite.

Por fim, e a partir do ensaio clínico, podemos concluir que as vacas submetidas aleatoriamente ao estudo, e que apresentavam hipocalcemia subclínica, manifestaram alguns dos problemas apresentados pelas vacas com hipocalcemia severa; podemos ainda concluir que esses problemas são apresentados também por vacas em que os níveis de cálcio se encontram dentro dos parâmetros fisiológicos.

Portanto, não pode ser confirmada, de forma peremptória, a existência de uma relação directa entre a hipocalcemia subclínica e os problemas reprodutivos e produtivos apresentados pelas vacas portadoras dessa doença.

## Bibliografia

- Abu Damir, H., Phillippo, M., Thorp, B.H., Milne, J.S., Dick, L. & Nevison, I.M. (1994). Effects of dietary acidity on calcium balance and mobilization, bone morphology and 1,25 – dihydroxyvitamin D in prepartal dairy cows. *Res. Vet. Sci.*, 56, 310.
- Arnaud, C.D., Tsao, H.S. & Littledike, T. (1971). Radioimmunoassay of human parathyroid hormone in serum. *J. Clin. Invest.*, 50, 21.
- Bauman D. E., Mather I. H., Wall R. J., Lock A. L. (2006). Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *J. Dairy Sci.*, 89:1235–1243
- Beck, N. & Webster, S.K. (1976). Effects of acute metabolic acidosis on parathyroid hormone action and calcium mobilization. *Am. J. Physiol.*, 230, 127.
- Beede, D.K., Wang, C., Donovan, G.A. Archibald, L.F. & Sanches, W.K. (1991). Dietary cation-anion difference (electrolyte balance) in late pregnancy. *Florida Dairy Prod. Conf.*, April 10, 1991, Univ. Florida, Gainesville.
- Beitz, D.C., Burkhart, D.J. & Jacobson, N.L. (1974). Effects of calcium to phosphorus ratio in the diet of dairy cows on incidence of parturient paresis. *J. Dairy Sci.*, 57, 49.
- Boda, J.M. & Cole, H.H. (1954). The influence of dietary calcium and phosphorus on the incidence of milk fever in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 37, 360. (na pág. 12 está 1995)
- Bronner, F. (1987). Intestinal calcium absorption: mechanism and applications. *J. Nutr.*, 117, 1347.
- Capen, C.C. & Young, D.M. (1967). The ultrastructure of the parathyroid glands and thyroid parafollicular cells of cows with parturient paresis and hypocalcemia. *Lab. Invest.*, 17, 717.
- Clegg, R. A., L. Pooley, I. Ernens, Y. Larondelle, and M. T. Travers. 2001. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. *Livest. Prod. Sci.* 70:3-14.
- Costa, E.M., Hirst, M.A. & Feldman, D. (1985). Regulation of 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors by vitamin D analogs in cultured mammalian cells. *Endocrinology*, 117, 2203.
- Curtis, C.R., Erb, N.H., Sniffen, C.J. & Smith, A.D. (1984). Epidemiology of parturient paresis: predisposing factors with emphasis on dry cow feeding and management. *J. Dairy. Sci.*, 67, 817.
- Curtis, C.R., Erb, N.H., Sniffen, C.J., Smith, A.D., Powers, P.A., Smith, M.C., White, M.E., Hillman, R.B. & Pearson, E.J. (1983). Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *JAVMA*, 183, 559.
- DeLuca, H.F. (1984). The metabolism and function of vitamin D. In R. Kumar (Ed.). *Vitamin D: Basic and clinical aspects*. (p. 1). Martinus Nijhoff Pub., Boston, MA.
- Divers, T. J., & Peek, S. F. (2008). Metabolic Diseases. In *Disease of Dairy Cattle* (pp. 590-603). Saunders Elsevier.

- Ender, F., Dishington, I.W. & Helgebostad, A. (1971). Calcium balance studies in dairy cows under experimental induction and prevention of hypocalcemic paresis puerperalis. The solution of the aetiology and the prevention of milk fever by dietary meas. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.*, 28, 233.
- Forsyth, Isabel A. (1986). Variation Among Species in the Endocrine Control of Mammary Growth and Function: The Roles of Prolactin, Growth Hormone, and Placental Lactogen. *J. Dairy Sci.*, 69, 886.
- Gaynor, P.J., Mueller, F.J., Miller, J.K., Ramsey, N., Goff, J.P. & Horst, R.L. (1989). Parturient hypocalcemia in Jersey cows fed alfalfa haylage-based diets with different cation to anion ratios. *J. Dairy Sci.*, 72, 2525.
- Goff, J. P., Reinhardt, T. A. and Horst, R. L. 1991. Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. *J. Dairy Sci.* 74: 4022–4032.
- Goff, J.P. & Horst, R.L. (1994). Calcium salts for treating hypocalcemia: carrier effects, acid-base balance, and oral versus rectal administration. *J. Dairy Sci.*, 77, 1451.
- Goff, J.P. & Horst, R.L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.*, 80, 1260-
- Goff, J.P. & Horst, R.L. (1997). Effect of dietary potassium and sodium, but not calcium on the incidence of milk fever in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80, 176.
- Goff, J.P., Horst, R.L., Muller, F.J., Miller, J.K., Kiess, G.A. & Dowlen H.H. (1991). Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *J. Dairy Sci.*, 74, 3863.
- Goff, J.P., Horst, R.L. & Reinhardt, T.A. (1988). Duodenum and colon 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) receptor concentration is increased during lactation in the rat. In A.W. Norman, K. Schaefer, H.G. Griogoliet & D.V. Herrat (Eds.). *Vitamin D. Molecular, cellular and clinical endocrinology*. (p. 246). Walter de Gruyter & Co., Berlin, Gemany.
- Goff, J.P., Kehrli Jr., M.E. & Horst, R.L. (1989). Periparturient hypocalcemia in cows: prevention using intramuscular parathyroid hormone. *J. Dairy. Sci.*, 72, 1182.
- Goff, J.P., Littledike, E.T. & Horst, R.L. (1986). Effect of synthetic bovine parathyroid in dairy cows: prevention of hypocalcemic parturient paresis. *J. Dairy Sci.*, 69, 2278.
- Goff, J.P., Reinhardt, T.A., Beckman, M.J. & Horst, R.L. (1990). Contrasting effects of exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D versus endogenous 1,25(OH)<sub>2</sub>D induced by dietary calcium restriction on vitamin D receptor. *Endocrinology*, 126, 1031.
- Goings, R.L., Jacobson, N.L., Beitz, D.C., Littledike, E.T. & Wiggers, K.D. (1974). Prevention of parturient paresis by a prepartum, calcium-deficient diet. *J. Dairy Sci.*, 57, 1184.
- Green, H.B., Horst, R.L., Beitz, D.C. & Littledike, E.T. (1981). Vitamin D metabolites in plasma of cows fed a prepartum low-calcium diet for prevention of parturient hypocalcemia. *J. Dairy Sci.*, 64, 217.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2000). Parathyroid hormone, calcitonin, calcium and phosphate metabolism, vitamin D, bone, and teeth. In *Medical Physiology*, Tenth edition (pp. 899-915). USA: W.B. Saunders Company.

- Hallagren, W. (1965). Prophylaxis of milk fever using oral calcium chloride solutions. *Wien. Tieraerztl. Monatsschr.*, 52, 359
- Halloran, B.P. & DeLuca, H.F. (1980). Calcium transport in small intestine during pregnancy and lactation. *Am. J. Physiol.*, 239, E64.
- Hansard, S.L., Comar, C.L. & Plumlee, M.P. (1954). The effect of age upon calcium utilization and maintenance requirements in the bovine. *J. Anim. Sci.*, 13, 25.
- Haussler, M.R., Mangelsdorf, D.J., Komm, B.S., Terpening, C.M., Yamaoka, K., Allegretto, E.A., Baker, A.R., Shine, J., McDonnell, D.P., Huges, M., Weigel, N.L., O'Malley, B.W. & Pike, J.W. (1988). Molecular biology of the vitamin D hormone. *Rec. Progr. Hormone Res.*, 44, 263.
- Hernández, E. G., Bouda, J., García, J. Á., & Hernández, J. A. (2009). Effect of postpartum administration of calcium salts and glucose precursors on serum calcium and ketone bodies in dairy cows. *Veterinaria México*, vol. 40, No. 1 , 17-26.
- O'Malley, B.W. & Pike, J.W. (1988). Molecular biology of the vitamin D hormone. *Rec. Progr. Hormone Res.*, 44, 263.
- Hibbs, J. (1950). Milk fever (parturient paresis) in dairy cows: a review. *J. Dairy Sci.*, 33, 758.
- Hibbs, J.W. & Pounden, W.D. (1955). Studies on milk fever in dairy cows. IV. Prevention by short time, prepartum feeding of massive dose of vitamin D. *J. Dairy Sci.*, 38, 65.
- Holick, M.F., MacLaughlin, J.A., Clark, M.B., Holick, S.A., Potts Jr., J.T., Anderson, R.R., Blank, I.H., Parrish, J.A. & Elias, P. (1980). Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and physiological consequences. *Science*, 210, 203.
- Horst, R.L. (1986). Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 69, 604.
- Horst, R.L., DeLuca, H.F. & Jorgensen, N.A. (1978). The effect of age on calcium absorption and accumulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal mucosa of rats. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.*, 1, 29.
- Horst, R.L., Goff, J.P. & Reinhardt, T.A. (1990). Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology*, 126, 1053.
- Horst, R.L., Jorgensen, N.A. & DeLuca, H.F. (1978). Plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels in paretic dairy cows. *Am. J. Physiol.*, 235, E634.
- Horst, R.L. & Reinhardt, T.A. (1983). Vitamin D metabolism in ruminants and its relevance to the parturient cow. *J. Dairy Sci.*, 66, 661.
- Hove, K. & Kristiansen, T. (1984). Oral 1,25-dihydroxyvitamin D3 in prevention of milk fever. *Acta Vet. Scand.*, 25, 510.
- Hurley, W.L. & Doane, R.M. (1989). Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *J. Dairy Science*, Vol. 72, Issue 3, 784-804.
- Jonhson, J.A., Beckmana, M.J. Pansini-Porta, A., Christakos, S., Bruns, M.E., Beitz, D.C. Horst, R.L. & Reinhardt, T.A. (1995). Age and gender effects on 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulated gene expression. *Exp. Gerontol.*, 30, 631.



- Jorgensen, N.A. (1974). Combating milk fever. *J. Dairy Sci.*, 57, 933.
- Jurutka, P.W., Hsieh, J.C. & Haussler, M.R. (1993). Phosphorylation of human 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor by cAMP-dependent protein kinase, in vivo and in transfected COS-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191, 1089.
- Kendall, K.A., Harshbarger, K.E., Hays, R.L. & Ormiston, E.E. (1970). Diet and prepartum milking as possible factor relating to paresis syndrome in dairy cattle. In *Parturient Hypocalcemia*. (p. 70). Academic Press, New York, NY.
- Kichura, T.S., Horst, R.L., Beitz, D.C. & Littledike, E.T. (1982). Relationship between prepartal dietary calcium and phosphorus, vitamin D metabolism, and parturient paresis in dairy cows. *J. Nutr.*, 112, 480.
- Klein, Bradley G. (1997). The Mammary Gland. *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology Second Edition*, 439.
- Kusumanti, E., Agger, J.F. & Jensen, K. (1993). Association between incidence risk of milk fever and lactation number, breed and season. *Acta Vet. Scand.*, S89, 141.
- Lema, M., Tucker, W.B., Aslam, M., Shin, I.S., LeRuyet, P. & Adams, G.D. (1992). Influence of calcium chloride fed prepartum on severity of edema and lactational performance of dietary heifers. *J. Dairy Sci.*, 75, 2388.
- Levy, F.O., Eikvar, L., Jutte, N.H.P.M. & Hansson, V. (1984). Properties and compartmentalization of the testicular receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 438, 591.
- Littledike, E.T. (1976). Relationship of milk secretion to hypocalcemia in the dairy cow. National Animal Disease Center, North Central Region, Agriculture Research Service, P. O. box 70.
- Littledike, E.T. & Horst, R.L. (1982). Inappropriate plasma 1,25(OH)<sub>2</sub>D response to parturient hypocalcemia in cows treated with vitamin D3, 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 or 1,25,26-(OH)<sub>3</sub>D3 prepartum. In A.W. Norman, K. Schaefer, D.V. Herrath & H.G. Grigoleit (Eds.). *Vitamin D, chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism*. (p. 475). Proc. 5th Int. Workshop on Vitamin D, Williamsburg, VA. W. de Gruyter & Co New York, NY.
- Malluche, H.H. & Faugere, M.C. (Ed.). (1986). In *Atlas of mineralized bone histology*. (p. 46). Karger, New York, NY.
- Marx, S.J., Liberman, U.A. & Eil, C. (1983). Calciferols: actions and deficiencies in action. *Vitam. Horm.*, 40, 235.
- Maynard, L.A., Loosli, J.K., Hintz, H.F. & Wagner, R.G. (1979). Reproduction. In *Animal nutrition*. (p. 472). Ch. 16. 7th ed. McGraw-Hill, New York, NY.
- Morrow, D.A. (1980). The role of nutrition in dairy cattle reproduction. In D.A. Morrow (Ed.). *Current therapy in theriogenology*. (p. 449). WB Saunders Co., Philadelphia, PA.
- Mulligan, F., O'Grady, L., Rice, D., & Doherty, M. (2006). A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Animal Reproduction Science*, vol. 96, 331-353.

- National Research Council. (1989). Nutrient requirements of dairy cows. 6th rev. ed. Nalt. Acad. Sci., Washington, DC.
- Newton, C. D., & Nunamaker, D. M. (1985). Calcium-Regulating Hormones and Metabolic Bone Disease. Textbook of Small Animal Orthopaedics, Cap. 42 , 1-17.
- Norman, A.W., Roth, J. & Orci, L. (1982). The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptor, and biological response (calcium binding proteins) *Endocr. Rev.*, 3, 331.
- Oetzel, G.R. (1993). Effects of prophylactic treatment with a calcium chloride gel on serum calcium concentration at calving, milk fever, and displaced abomasum in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 76 (Suppl. 1), 304A. (Abstr.)
- Oetzel, G.R. & Barmore, J.A. (1993). Intake of a concentrate mixture containing various anionic salts fed to pregnant, non-lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 76, 1617.
- Oetzel, G.R., Olson, J.D. Curtis, C.R. & Fettman, M.J. (1988). Ammonium chloride and ammonium sulphate for prevention of parturient paresis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 71, 3302.
- Pansu, D., Bellaton, C. & Bronner, F. (1983). Developmental changes in the mechanisms of duodenal calcium transport in rat. *Am. J. Physiol.*, 244, G20.
- Payne, J.M. (1968). Outlook on milk fever. *Outlook Agric.*, 5, 266.
- Pugh, D.G., Elmore, R.G. & Hembree, T.R. (1985). A review of the relationship between mineral nutrition and reproduction in cattle. *Bovine Pract.*, 20, 10.
- Ramberg Jr., C.F., Jonhson, E.K., Fargo, R.D. & Kronfeld, D.S. (1984). Calcium homeostasis in cows, with special reference to parturient hypocalcemia. *Am. J. Physiol.*, 246, R698.
- Reinhardt, T.A., Napoli, J.L. Beitz, D.C., Littledike, E.T. & Horst, R.L. (1981). A new in vivo metabolite of vitamin D3: 1,25,26-trihydroxyvitamin D3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99, 302.
- Reinhardt, T.A. & Horst, R.L. (1989). Ketoconazole inhibits self-induced metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and amplifies 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor up-regulation in rat osteosarcoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 272, 459.
- Reinhardt, T.A., & Horst, R.L. (1990). Parathyroid hormone down-regulates 1,25-dihydroxyvitamin (VDR) and VDR mRNA in vitro and blocks homologous up-regulation in vivo. *Endocrinology*, 127, 942.
- Reinhardt, T.A. & Horst, R.L. (1989). Self-induction of 1,25-dihydroxyvitamin D3 metabolism limits receptor occupancy and target tissue responsiveness. *J. Biol. Chem.*, 264, 15917.
- Schiffli, H., & Binswagner, U. (1980). Calcium ATPase and intestinal calcium transport in uremic rats. *Am. J. Physiol.*, 238, G424.
- Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N., Nash, D. M., & Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal*, vol. 176 , 115-121.

- Steenbock, H. & Black, A. (1924). Fat soluble vitamins XVII. The induction of growth promoting and calcifying properties in ration exposed to ultraviolet light. *J. Biol. Chem.*, 61, 405.
- Tanaka, Y., & Deluca, H.F. (1973). The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch. Biochem. Biophys.*, 154, 566.
- Tsang, C.P.W. & Grunder, A.A. (1984). Effects of vitamins D deficiency on etadiol metabolism in the laying hen. *Endocrinology*, 115, 2170.
- Tucker, W.B., Hogue, J.F., Waterman, D.F., Swenson, T.S., Xin, Z., Hemken, R.W., Jackson, J.A., Adams, G.D. & Spicer, L.J. (1991). Role of sulphur and chloride in the dietary cation-anion balance equation for lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.*, 69, 1205.
- Veldhuis, J.D. & Klase, P.A. (1982). Mechanisms by which calcium ions regulate the steroidogenic actions of luteinizing hormone in isolated ovarian cells in vitro. *Endocrinology*, 111, 1.
- Ward, G., Marion, G.B., Campbell, C.W. & Dunham, J.R. (1971). Influences of calcium intake and vitamin D supplementation on reproductive performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 54, 204.
- Warenbourg, M., Perret, C. & Thomasset, M. (1986). Distribution of vitamin D - dependent calcium binding protein messenger ribonucleic acid in rat placenta and duodenum. *Endocrinology*, 119, 176.
- Wark, J.D. & Tashjian Jr., A.H. (1982). Vitamins D stimulates prolactina synthesis by GH4C1 cells incubated in chemically defined medium. *Endocrinology*, 111, 1755.
- Wasserman, R., Fullmer, C.S. & Shimura, F. (1984). Calcium absorption and the molecular effects of Vitamin D3. In R. Kumar (Ed.). *Vitamin D: Basic and clinical aspects*. (p. 233). Martinus Nijhoff Plub., Boston, MA.
- Wermuth, N.C. 1990. New treatment of milk fever. Abstract No. 525, Proc. XVI World Buiatr. Congr., Salvador Bahia, Brazil. SOGEPACO, Bologna, Italy.
- Wu, W., Liu, J., Xu, G., & Ye, J. (2008). Calcium homeostasis, acid–base balance, and health status in periparturient Holstein cows fed diets with low cation–anion difference. *Livestock Science*, vol. 117 , 7-14.

